



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

UTILIZAÇÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA E AgELISA PARA DETECÇÃO DE
PORTADORES DO VÍRUS DA DIARREIA BOVINA VIRAL EM BOVINOS DE
ENGORDA

RUTE MARINA GARCIA DA NOIVA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Doutora Maria da Conceição da
Cunha e Vasconcelos Peleteiro

Doutor George Thomas Stilwell

Dr. Manuel Ferreira Joaquim

ORIENTADOR

Doutora Maria da Conceição da
Cunha e Vasconcelos Peleteiro

CO-ORIENTADOR

Dr. Manuel Ferreira Joaquim

2010

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

UTILIZAÇÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA E AgELISA PARA DETECÇÃO DE
PORTADORES DO VÍRUS DA DIARREIA BOVINA VIRAL EM BOVINOS DE
ENGORDA

RUTE MARINA GARCIA DA NOIVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Doutora Maria da Conceição da
Cunha e Vasconcelos Peleteiro

Doutor George Thomas Stilwell

Dr. Manuel Ferreira Joaquim

ORIENTADOR

Doutora Maria da Conceição da
Cunha e Vasconcelos Peleteiro

CO-ORIENTADOR

Dr. Manuel Ferreira Joaquim

2010

LISBOA

Dedicatória

À minha família, de sangue e de coração, feita de quem me viu nascer, de quem me ajudou a crescer, e de quem me há-de ver singrar...

Serei sempre por vós...

A cada pedra do caminho...

A cada curva na estrada...

Serei sempre convosco...

Agradecimentos

A autora gostaria de agradecer a todos os assistentes técnicos, administrativos, assistentes operacionais, técnicos, patologistas e professores do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, pelo seu apoio incondicional e pelos conhecimentos que tão generosamente partilharam ao longo de seis meses de intenso trabalho. Foi um verdadeiro e raro privilégio trabalhar com uma equipa de tal calibre, que não hesitou em acolher uma estagiária inexperiente no seu seio.

Adicionalmente, gostaria de agradecer à Prof^a. Dr^a. Ana Duarte pela sua disponibilidade e auxílio no decorrer das técnicas de ELISA, assim como pela disponibilização do espaço e equipamentos laboratoriais necessários aos mesmos. A autora deseja, igualmente, agradecer ao Dr. Bill DuBois e à Dra. Deborah Haines, pelo auxílio e simpatia na fase de pesquisa bibliográfica.

Um agradecimento muito especial também à Dra. Rute Canejo-Teixeira e ao Prof. Dr. Mário Quaresma pelos seus ombros amigos, sempre presentes, sempre prestáveis e, infelizmente, nunca tão retribuídos como gostaria.

Gostaria, ainda, de agradecer aos produtores e pessoal das explorações de engorda visadas por este estudo, pela sua cooperação durante a elaboração do mesmo.

Finalmente, mas não com menos gratidão, a autora deseja agradecer aos seus orientadores, a Prof^a. Dr^a. Conceição Peleteiro e o Dr. Manuel Joaquim, pelo excelente apoio que proporcionaram, por toda a experiência e conhecimento que partilharam, e por tantas novas ideias e desafios que darão muito em que pensar (e, esperemos, muito em que trabalhar).

Este estudo foi financiado por fundos concedidos pela Pfizer Saúde Animal.

Resumo

Utilização de Imunohistoquímica e AgELISA para Detecção de Portadores do Vírus da Diarreia Bovina Viral em Bovinos de Engorda

A Diarreia Bovina Viral é uma das doenças infecciosas dos bovinos de engorda com maior impacto económico, afectando negativamente todas as fases de produção. Os animais imunotolerantes, persistentemente infectados (PI) pelo BVDV constituem o seu principal reservatório, e a sua detecção e eliminação é importante no controlo da transmissão do vírus na manada. O objectivo deste estudo consistiu em utilizar imunohistoquímica e AgELISA em amostras de biópsia de pele de bovinos de engorda, para detectar infecções persistentes. Adicionalmente, procedeu-se à revisão do conhecimento actual sobre a Diarreia Bovina Viral.

Foram testados 100 vitelos, entre as duas e as 84 semanas de idade. As amostras de pele, fixadas em formol, foram marcadas para antígenos do BVDV por imunohistoquímica, e os resultados comparados com os obtidos por AgELISA, em amostras frescas de pele. Os resultados obtidos foram incompatíveis com infecções persistentes, para todas as amostras, pelo que nenhum dos animais testados foi classificado como PI. Contudo, doze animais que foram negativos ao AgELISA exibiram padrões de marcação imunohistoquímica compatíveis com infecção aguda. Uma vez que a prevalência elevada de animais persistentemente infectados pode aumentar o número de infecções agudas, seria importante determinar a prevalência nacional de infecções persistentes.

Palavras-Chave: Diarreia Bovina Viral; imunohistoquímica; AgELISA; infecção persistente

Abstract

Using Immunohistochemistry and AgELISA to Detect Animals Persistently Infected with Bovine Viral Diarrhea Virus in Feedlot Cattle

Bovine viral diarrhea is one of the most economically significant infectious diseases of beef cattle, having a negative impact over all stages of production. Immunotolerant, persistently infected (PI) animals are the main reservoir for this virus, and their detection and elimination is important, in order to control its transmission in a herd. The objective of this study was to use immunohistochemical analysis and AgELISA on skin biopsy samples from beef calves, in order to detect persistent infections. Additionally, current knowledge on Bovine Viral Diarrhea was reviewed.

One hundred 2 to 84 week-old calves were tested. Formalin-fixed skin biopsy samples were stained for BVDV antigens by immunohistochemistry, and the results were compared to those obtained by AgELISA, performed on fresh skin samples. The results obtained were incompatible with persistent infection, for all samples, so none of the calves tested was classified as a PI animal. However, twelve animals that tested negative with AgELISA exhibited immunohistochemical staining patterns compatible with acute infection. Since a high prevalence of persistently infected animals can increase the number of acute infections, it would be important to determine the national prevalence of persistent infection.

Keywords: Bovine Viral Diarrhea; immunohistochemistry; AgELISA; persistent infection

Índice

Introdução Teórica.....	1
Introdução Histórica	3
Etiologia	5
Epidemiologia.....	10
Transmissão do BVDV intra-manada	11
Transmissão do BVDV entre manadas	13
Fisiopatologia	16
Infecção primária pós-natal	16
Infecção pré-natal.....	22
Doença das Mucosas	27
Lesões.....	29
Infecção primária pós-natal	29
Infecção pré-natal (<i>in utero</i>)	30
Doença das Mucosas	31
Sinais Clínicos.....	34
Infecção primária pós-natal	34
Infecção pré-natal (<i>in utero</i>)	35
Doença das Mucosas	35
Efeitos do BVDV nas explorações de bovinos de engorda	37
Diagnóstico	38
Isolamento do vírus (IV)	38
Detecção de antígeno viral	39
ELISA para captura de antígeno (AgELISA)	39
Imunofluorescência (IF).....	40
Imunohistoquímica (IHQ)	40
Detecção de ARN viral	41
RT-PCR	42

Detecção de anticorpos.....	42
Imunodifusão em gel de agarose	42
Neutralização viral (NV)	43
ELISA para detecção de anticorpos (AcELISA)	43
Imunofluorescência indirecta (IFI)	44
Western Blotting.....	44
Tratamento, Prevenção, Controlo	45
Trabalho Experimental.....	51
Objectivos	53
Materiais e métodos.....	53
Animais.....	53
Obtenção e processamento das amostras.....	53
AgELISA	55
Imunohistoquímica	55
Resultados	57
AgELISA.....	57
Imunohistoquímica	57
Discussão.....	60
Conclusão	63
Bibliografia	65
Anexo I. Países em que se encontram documentadas infecções pelo vírus da Diarreia Bovina Viral.....	77
Anexo II. Tecidos e tipos celulares em que é possível identificar a presença do BVDV.	79
Anexo III. Processamento histológico e coloração de rotina.	81
Anexo IV. Protocolo de AgELISA para detecção do vírus da Diarreia Bovina Viral.	83
Anexo V. Protocolo de imunohistoquímica para detecção do vírus da Diarreia Bovina Viral.....	85

Índice de Figuras

Figura 1. Representação esquemática do vírus da Diarreia Bovina Viral	5
Figura 2. Mapa estrutural do genoma do vírus da Diarreia Bovina Viral	6
Figura 3. Dinâmica de transmissão do BVDV.	12
Figura 4. Diagrama de uma estratégia de testagem a ser utilizada na presença de BVDV circulante na exploração.	46
Figura 5. Diagrama de uma estratégia de testagem de rotina para pesquisa de animais PI.	47
Figura 6. Material utilizado na colheita de amostras.	53
Figuras 7 (A a F) Fotografias do acto de colheita das amostras de pele.	54
Figura 8. Placas e reagentes incluídos no kit AgELISA utilizado.	55
Figura 9. Placa de AgELISA, exibindo resultados negativos.....	57
Figura 10. (A a F) Exemplos de casos negativos à imunohistoquímica para detecção do BVDV (ABC, Hematoxilina de Mayer).	58
Figura 11. (A a D) Exemplos de padrões de marcação multifocal por imunohistoquímica (ABC, Hematoxilina de Mayer).	59
Figura 12. Imagens microscópicas de intestino com marcação positiva para BVDV, utilizado como controlo positivo (ABC, Hematoxilina de Mayer).	59

Índice de Tabelas

Tabela 1. Espécies em que se encontra descrita a infecção pelo BVDV.....	10
Tabela 1. Espécies em que se encontra descrita a infecção pelo BVDV (continuação).	11
Tabela 2. Efeitos do vírus da Diarreia Bovina Viral sobre o sistema imunitário	17
Tabela 3. Número de amostras colhidas por local de colheita e raça dos animais.....	53

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Possíveis consequências da infecção pelo vírus da Diarreia Bovina Viral sobre a reprodução.....	22
--	----

Abreviaturas

ABC	<i>Avidin-Biotin Complex</i>
AcELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> para detecção de anticorpos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AgELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> para detecção de antígenos
Amp	Ampliação
ARN	Ácido ribonucleico
BHV-1	Herpesvirus Bovino 1
BRSV	Vírus Respiratório Sincicial dos Bovinos
BVD	Diarreia Bovina Viral
BVDV	Vírus da Diarreia Bovina Viral
BVDV-1	Vírus da Diarreia Bovina Viral tipo 1
BVDV-2	Vírus da Diarreia Bovina Viral tipo 2
CCID ₅₀	Dose infectante para 50% das culturas de células
CCP	Proteína de controlo do complemento
CD14	Receptor para lipopolissacarídeos
CD4 ⁺	Núcleo de diferenciação 4 (linfócitos T helper)
CD46	Núcleo de diferenciação 46
CD8 ⁺	Núcleo de diferenciação 8 (linfócitos T-citotóxicos)
cp	Citopático
DAB	Diaminobenzidina
dsARN	ARN de dupla cadeia
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
Fc	Fragmento da região constante das imunoglobulinas
FCS	Soro Fetal de Bovino
GALT	Tecidos linfóides associados ao intestino
IETS	<i>International Embryo Transfer Society</i>
IF	Imunofluorescência
IFI	Imunofluorescência indirecta
IFN	Interferão
IFN- α	Interferão alfa
IFN α/β	Interferão alfa/beta
IFN- β	Interferão beta
IFN- γ	Interferão gama
IHQ	Imunohistoquímica

IL-1	Interleucina 1
IRF-3	Factor regulador de interferão 3
IV	Isolamento viral
kDa	kiloDalton
LDL-R	Receptor de lipoproteínas de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
MALT	Tecido linfóide associado às mucosas
mARN	ARN mensageiro
MHC I	Complexo maior de histocompatibilidade classe I
MHC II	Complexo maior de histocompatibilidade classe II
ncp	Não-citopático
NK	<i>Natural killer</i>
NO	Óxido nítrico
NV	Neutralização viral
OIE	<i>Office International des Epizooties</i>
PAMP	Padrão molecular associado a patógeno
PAS	Coloração pelo ácido periódico de Schiff
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão fosfato salino)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PI	Persistentemente infectado
PIV-3	Vírus da Parainfluenza Bovina 3
PRR	Receptor de reconhecimento de padrão
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
ssARN	ARN de cadeia simples
TAP	<i>Antigen Transporter Protein</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i> (Tampão Tris salino)
TCID	Dose infectante para cultura de tecidos
TCID ₅₀	Dose infectante para 50% das culturas de tecidos
TCID _{50/ml}	Dose infectante para 50% das culturas de tecidos por mililitro
Th1	T <i>helper</i> 1
Th2	T <i>helper</i> 2
TI	Transitoriamente infectado
TNF- α	Factor de necrose tumoral alfa

Introdução Teórica

Introdução Histórica

Durante a década de 1940-50, foi descrita uma doença de origem desconhecida. A então designada “Doença X” foi descrita, no Canadá, como sendo uma doença com duas formas: aguda e sub-aguda (Childs, 1946; Goens, 2002). A forma aguda afectava os animais jovens, culminando na sua morte, após 7 a 10 dias. Os sinais exibidos pelos animais adultos eram mais severos e explosivos, incluindo: pirécia, diarreia aquosa e sanguinolenta, desidratação, tenesmo, taquipneia, taquicardia, orelhas caídas, anorexia, corrimento nasal e ocular, hipersalivação e desenvolvimento de úlceras nas narinas, focinho, lábios, e mucosas da cavidade oral. Os animais apresentavam, ainda, lesões nas regiões inguinal e perineal, na face interna das coxas e no interior das orelhas. A morte sobrevinha em 3 a 4 dias. Os exames *post mortem* dos animais afectados revelaram lesões erosivas nas narinas e na traqueia, assim como no sistema digestivo. Os pré-estômagos encontravam-se pouco afectados, mas o abomaso foi descrito como estando praticamente desprovido de epitélio. As lesões intestinais consistiam em ulcerações, mais severas nas porções mais distais do intestino delgado. Foram observadas hemorragias petequiais no córtex renal, nos ureteres e no interior de linfonodos hipertrofiados. Foi ainda notada uma redução considerável do volume sanguíneo e do tempo de coagulação (Childs, 1946).

Acreditava-se que a forma sub-aguda já estaria presente na região há anos, afectando e levando à morte de um ou dois animais por manada, em surtos com várias semanas de intervalo (Goens, 2002).

A Diarreia Bovina Viral (BVD) foi descrita pela primeira vez por Olafson e seus colaboradores, em 1946, em gado bovino, no Estado de Nova Iorque, EUA. A doença era caracterizada por abortos, febre, inapetência, diarreia e ulceração do tracto gastrointestinal (Potgieter, 2004).

Os sinais clínicos e achados *post mortem* eram consistentes com aqueles descritos para a Doença X. Contudo, Olafson restringiu o termo Doença X a uma doença semelhante, mas crónica, que se caracterizava por emaciação, espessamento e desidratação da pele, lesões proliferativas da língua, palato e esófago; e espessamento da vesícula e ductos biliares, resultando em taxas de mortalidade muito elevadas. Ao contrário da Doença X, cujas tentativas de transmissão haviam falhado, a doença descrita por Olafson et al. era reprodutível. Esta doença encontrava-se, ainda, associada a sinais adicionais de doença respiratória, leucopénia, quebras da produção leiteira e aumento da percentagem de abortos (Goens, 2002).

Nos anos 50, foi observada uma doença, até então desconhecida, no gado bovino, no Estado do Iowa. As lesões provocadas por esta nova síndrome, então designada “Doença das Mucosas” (MD), eram variáveis, e consistiam primariamente em erosões e hemorragias do tracto gastrointestinal, com infiltração celular mínima. Em 1957, foi isolado e cultivado um vírus citopático de um caso de Doença das Mucosas. No mesmo ano, foi propagado um vírus

não-citopático de casos típicos de Diarreia Bovina Viral. Três anos mais tarde, foi cultivado um vírus citopático de um caso de BVD, em gado do Oregon, EUA (Goens, 2002).

No fim da década de 1960, o termo “Doença X” tinha-se expandido para incluir um espectro de doenças virais (Goens, 2002). A Diarreia Bovina Viral era considerada uma doença enzoótica, associada a surtos esporádicos de alta morbidade e baixa mortalidade. Inversamente, a Doença das Mucosas afectava o gado jovem, apresentando 2 a 50% de morbidade, mas mortalidade próxima dos 100% (Jubb & Kennedy, 1963). Quando os investigadores tentavam reproduzir a Doença das Mucosas com isolados de vírus citopáticos, a doença resultante assemelhava-se a uma forma ligeira de BVD (Goens, 2002). Esta observação deu origem a especulações de que a Doença das Mucosas e a Diarreia Bovina Viral seriam a mesma doença com pequenas variações (Jubb & Kennedy, 1963). No entanto, só em 1984 é que a Doença das Mucosas foi reproduzida com sucesso, utilizando o vírus da Diarreia Bovina Viral (Goens, 2002).

A pesquisa sobre a patogenia do complexo Diarreia Bovina Viral-Doença das Mucosas, durante as décadas de 1960 e 1970, concentrou-se nas infecções experimentais, particularmente em animais gestantes e neonatos. Esta pesquisa revelou a associação entre a infecção intra-uterina pelo vírus e o nascimento de animais imunotolerantes, persistentemente infectados (PI) pelo vírus (Goens, 2002).

No fim dos anos 80, o vírus da Diarreia Bovina Viral (BVDV) foi classificado como pertencendo ao género *Pestivirus*, juntamente com o vírus da *Border Disease* e o vírus da Peste Suína Clássica (Radostits & Littlejohns, 1988). No fim da mesma década, foi relatada, em vários países, uma síndrome hemorrágica, em bovinos adultos e jovens, causada por BVDV não-citopático, não-associado a uma estirpe citopática. Esta síndrome era caracterizada por febre e marcada trombocitopenia, dando origem a diarreia sanguinolenta, epistaxis, hemorragias petequiais e equimóticas nas membranas mucosas, e hemorragias nos locais de injeção (Goens, 2002).

Surtos de doença com sinais clínicos semelhantes aos da Doença das Mucosas e, mais variavelmente, aos da síndrome hemorrágica, relatados na Região dos Grandes Lagos, no Quebec e em Inglaterra, em 1993, atribuídos a um vírus não-citopático sem associação com uma estirpe citopática, marcaram o abandono da convicção de que a Diarreia Bovina Viral e a Doença das Mucosas podiam ser distinguidas, de forma segura, através da sua evolução clínica e lesões associadas (Carman et al., 1998; Goens, 2002).

Etiologia

O vírus da Diarreia Bovina Viral é um membro do género *Pestivirus*, da família *Flaviviridae* (Murray, Marcotrigiano, & Rice, 2008; Potgieter, 2004). Os viriões são partículas esféricas, de aproximadamente 50nm de diâmetro, com um envelope fortemente aderente, que contém três glicoproteínas diferentes (Figura 1) (Krey, Himmelreich et al., 2006; Potgieter, 2004; Tscherne, Evans, Macdonald, & Rice, 2008).

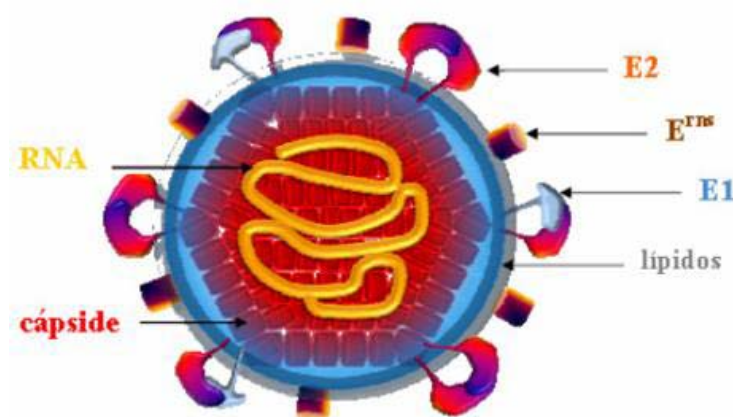


Figura 1. Representação esquemática do vírus da Diarreia Bovina Viral (Fevereiro, 2008).

O genoma do BVDV consiste numa cadeia única de ARN, de polaridade positiva, com um comprimento de 12,3 kilobases (Lackner, Muller, Konig, Thiel, & Tautz, 2005; Potgieter, 2004). O genoma viral contém uma única grelha de leitura aberta (ORF), flanqueada por regiões não-traduzidas 5' e 3', que codifica uma poliproteína com cerca de 4000 aminoácidos (Pankraz, Thiel, & Becher, 2005; Potgieter, 2004; Sun et al., 2003; Tscherne et al., 2008). Esta poliproteína sofre processamento, co- e pós-traducional, por um conjunto de proteases virais e celulares, dando origem às proteínas virais maduras, sequencialmente denominadas: N^{pro}, C, E^{TMS}, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, e NS5B (Figura 2) (Murray et al., 2008; Pankraz et al., 2005; Potgieter, 2004; Sun et al., 2003; Tscherne et al., 2008). O primeiro terço da grelha de leitura aberta codifica a protease viral N^{pro} e as proteínas estruturais C, E^{TMS}, E1, E2. Os dois terços restantes codificam as proteínas não-estruturais p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, e NS5B (Goens, 2002; Murray et al., 2008; Pankraz et al., 2005; Potgieter, 2004).



Figura 2. Mapa estrutural do genoma do vírus da Diarreia Bovina Viral (adaptado de Murray et al., 2008).

Sem homólogos entre os restantes géneros da família *Flaviviridae*, a protease N-terminal, N^{pro} é uma protease cisteína papaína-*like*, com cerca de 20 kDa. Foi demonstrado que a N^{pro} não é indispensável para a replicação viral, *in vitro*, do BVDV (Chen et al., 2007).

As quatro proteínas estruturais C, E^{ms}, E1 e E2 combinam-se com o ARN genómico e com a dupla camada lipídica do envelope para formar o virião (Choi et al., 2004; Krey, Himmelreich et al., 2006; Murray et al., 2008).

A proteína da cápside C tem um comprimento de 90 aminoácidos e é obtida a partir da poliproteína primária após três clivagens enzimáticas. A protease N^{pro} dirige a clivagem *cis*-terminal da poliproteína nascente, dando origem ao terminal amina da proteína C (Chen et al., 2007). As duas clivagens restantes são levadas a cabo no retículo endoplasmático da célula hospedeira, por enzimas celulares, que separam a proteína C da proteína E^{ms} e procedem ao seu processamento adicional. A proteína resultante não apresenta uma estrutura secundária significativa, possuindo um elevado número de resíduos básicos envolvidos na mediação de interacções de baixa afinidade com o ARN (Murray et al., 2008). Pensa-se que esta ligação de baixa afinidade ao ARN permitirá que o genoma viral seja libertado e acedido para tradução, após a entrada numa nova célula hospedeira (Krey, Moussay, Thiel, & Rumenapf, 2006; Murray et al., 2008).

Através de mecanismos pouco conhecidos, a proteína da cápside e o ARN viral são envolvidos por um envelope derivado da membrana do retículo endoplasmático, no qual se encontram embutidas as glicoproteínas E^{ms}, E1 e E2 (Murray et al., 2008). A glicoproteína do envelope E^{ms} apresenta actividade ARNase intrínseca, encontrando-se apenas tenuemente associada ao virião (Choi et al., 2004; Potgieter, 2004). Esta glicoproteína participa na adesão do vírus à célula, ligando-se a glicosaminoglicanos, como o sulfato de heparano (Krey, Himmelreich et al., 2006; Lecot, Belouzard, Dubuisson, & Rouille, 2005). A proteína estrutural E1 é uma glicoproteína transmembranária, que forma heterodímeros ligados por pontes dissulfureto com a glicoproteína E2, a principal glicoproteína do envelope viral (Agapov et al., 2004; Potgieter, 2004; Tscherne et al., 2008). Adicionalmente, o envelope é ainda constituído por homodímeros da proteína E2, igualmente ligados por pontes dissulfureto (Agapov et al., 2004; Tscherne et al., 2008). Tal como a glicoproteína E^{ms}, esta glicoproteína, de 53 kDa, encontra-se envolvida na adesão viral, ligando-se a proteínas membranárias (Lecot et al., 2005; Nobiron, Thompson, Brownlie, & Collins, 2003).

A produção de partículas infecciosas requer acções pouco definidas das proteínas não-estruturais p7 e NS2 (Murray et al., 2008). p7 é uma pequena proteína hidrofóbica, de 7 kDa, que, apesar de não integrar o virião, é essencial para a sua montagem (Tscherne et al., 2008). A proteína não-estrutural NS2, de 54kDa, é uma proteína hidrofóbica que só é funcional sob a forma do seu precursor, NS2-3 (Agapov et al., 2004; Murray et al., 2008). Este precursor desempenha um papel crucial, mas indefinido, na produção de viriões infectantes (Lackner et al., 2005). Pensa-se que a interacção da NS2-3 com o terminal carboxilo da proteína da cápside lhe permita participar na montagem da nucleocápside, possivelmente recrutando os componentes do virião para o local de montagem (Agapov et al., 2004).

O processamento da proteína NS2-3 em NS2 e NS3 é exercido por uma cisteína autoprotease, localizada em NS2. Esta clivagem é essencial para a replicação do BVDV, uma vez que a proteína não-estrutural NS3 não pode ser funcionalmente substituída pela NS2-3 (Lackner et al., 2005). NS3 é uma proteína hidrofílica, com 80 kDa, que possui, pelo menos, três actividades enzimáticas: helicase, NTPase e a actividade serina protease da sua proteína precursora, NS2-3 (Agapov et al., 2004; Gu et al., 2000; Murray et al., 2008; Potgieter, 2004). Juntamente com o seu co-factor, a proteína não-estrutural NS4A, a NS3 realiza o restante processamento das proteínas não-estruturais (Murray et al., 2008). A proteína NS4B encontra-se implicada na atenuação da citopatogenicidade do vírus da Diarreia Bovina Viral (Qu, McMullan, & Rice, 2001). Os resultados de um estudo efectuado por Qu, McMullan, & Rice (2001), sugerem que a NS4B integra, em conjunto com a NS3 e a NS5A, um complexo multiproteico que se encontra associado à membrana do retículo endoplasmático. A NS4B poderá actuar como uma “âncora membranária” e recrutar as duas restantes proteínas não-estruturais, de localização citoplasmática, para o retículo endoplasmático, onde ocorre a replicação viral (Qu et al., 2001).

A proteína não-estrutural NS5A é uma fosfoproteína que se encontra fortemente associada a uma ou mais cinases celulares (Sun et al., 2003). A proteína NS5B compõe um complexo de replicação, responsável pela replicação viral, que inclui quatro outras proteínas não-estruturais, entre as quais a NS3 (Lackner et al., 2005). A NS5B é uma ARN polimerase ARN-dependente, que catalisa a acumulação assimétrica de cadeias ARN(+), em detrimento das cadeias ARN(-) (Agapov et al., 2004; Murray et al., 2008).

Em comparação com os vírus ADN, os vírus ARN são altamente mutáveis. Os vírus ARN que apresentam sentido positivo, como o BVDV, estão sujeitos a modificações genómicas que envolvem mutações pontuais ou recombinação do ARN viral (Bolin & Grooms, 2004).

As mutações pontuais são extremamente comuns, uma vez que as polimerases virais são incapazes de detectar ou reparar os erros ocorridos durante a replicação, como acontece nos vírus ADN (Goens, 2002). Assim, a cada ciclo de replicação geram-se mutantes. O conjunto destes mutantes denomina-se quasiespécie (Bolin & Grooms, 2004).

Apesar do potencial para criar novos vírus ser elevado, a menos que se verifique uma vantagem selectiva para um dos mutantes, a população mutante tende a manter uma “sequência-mestre” de bases, que reflecte a sequência de bases do vírus original. Isto deve-se ao facto de a maioria das mutações pontuais ser deletéria para a sobrevivência do vírus, ou não proporcionar uma vantagem competitiva, que permita que um dos mutantes domine a quasiespécie. No entanto, a capacidade de gerar constantemente novos mutantes permite uma rápida adaptação do vírus à resposta imunitária do hospedeiro, prolongando a infecção e aumentando o período de excreção de partículas virais (Bolin & Grooms, 2004).

No caso do vírus da Diarreia Bovina Viral, a recombinação não tende a criar novos genótipos, mas pode alterar o biótipo viral (Bolin & Grooms, 2004).

Independentemente do biótipo, os isolados do vírus da Diarreia Bovina Viral podem ser agrupados, ou tipificados, em dois genótipos (BVDV-1 e BVDV-2), cada um com vários subgenótipos (Bolin & Grooms, 2004; Potgieter, 2004; Vilcek, Durkovic, Kolesarova, & Paton, 2005). Actualmente, encontram-se identificados, pelo menos, 15 subgenótipos do BVDV-1 (1a a 1o), e 4 subgenótipos do BVDV-2 (2a a 2d) (Giangaspero, Harasawa, Weber, & Belloli, 2008; Xue et al., 2008). A tipificação filogenética dos isolados é geralmente feita por comparação de sequências de bases derivadas de três regiões genéticas, correspondentes à região não-traduzida 5', à N^{pro} e à E2 (Hornberg et al., 2009; Kadir et al., 2008; Vilcek, Durkovic et al., 2005). Os genótipos virais apresentam uma homologia de cerca de 60% entre as suas sequências de bases, enquanto os subgenótipos apresentam uma homologia de cerca de 80 a 85% entre si. Cada subgenótipo inclui, ainda, um grupo de isolados virais que exibem aproximadamente 90% de semelhança entre as suas sequências de bases (Goens, 2002).

Ambos os genótipos do vírus apresentam isolados dos dois biótipos: citopático (cp) e não-citopático (ncp) (Carter, 2004; Kelling, 2004; Potgieter, 2004).

Os biótipos do vírus são definidos pelos seus efeitos em culturas celulares (Chen et al., 2007; Tscherne et al., 2008). A replicação de estirpes não-citopáticas não induz alterações óbvias na morfologia e viabilidade celular, enquanto que as estirpes citopáticas causam vacuolização e morte da célula infectada (Birk, Dubovi, Cohen-Gould, Donis, & Szeto, 2008; Bolin & Grooms, 2004; Lackner et al., 2005). Ambos os biótipos podem causar infecções agudas, mas apenas o vírus não-citopático é capaz de estabelecer infecções persistentes, cruciais para a manutenção do BVDV nas populações (Chen et al., 2007; Lackner et al., 2005). O vírus clássico é não-citopático, sendo este o biótipo mais prevalente na natureza (Bolin & Grooms, 2004; Carter, 2004). O vírus citopático é gerado a partir do vírus ncp, devido a fenómenos de recombinação do ARN viral (Bolin & Grooms, 2004; Goens, 2002). Esta recombinação pode ser homóloga ou heteróloga, por reorganização/duplicação da sequência de nucleótidos do genoma viral ou por inserção de sequências de ARN do hospedeiro no genoma viral, respectivamente. A recombinação ocorre, geralmente, na região genómica que codifica a

proteína NS2-3 do vírus não-citopático, e é responsável pela introdução de um local adicional de clivagem para protease, o que resulta na produção da proteína não-estrutural NS3 (Bolin & Grooms, 2004; Goens, 2002). Tanto as estirpes não-citopáticas como as estirpes citopáticas levam à expressão da NS2-3 em células infectadas. Contudo, a expressão da NS3 só se verifica nas células infectadas com estirpes citopáticas (Becher, Thiel, Collins, Brownlie, & Orlich, 2002; Qu et al., 2001). Consequentemente, esta proteína é considerada um marcador molecular das estirpes cp, e a causa do efeito citopático (Becher et al., 2002; Bolin & Grooms, 2004; Potgieter, 2004).

A reversão de um vírus citopático para um vírus não-citopático também é possível. O vírus ncp resultante geralmente perde a capacidade de expressar a NS3. No entanto, foram identificados alguns vírus não-citopáticos que mantêm a expressão de NS3, sem causar efeito citopático nas células infectadas (Bolin & Grooms, 2004).

Epidemiologia

As infecções por BVDV são endêmicas nas populações de gado bovino, na maioria dos países (Anexo I) (Lindberg & Houe, 2005; Radostits, Gay, Hinchcliff, & Constable, 2007). Em certos países, esta poderá constituir a mais importante infecção viral do gado (Radostits et al., 2007).

O leque de hospedeiros do vírus da Diarreia Bovina Viral encontra-se restringido aos animais ungulados (ordem *Artiodactyla*, e.g. ruminantes e suínos) (Krey, Moussay et al., 2006; Maurer, Krey, Moennig, Thiel, & Rumenapf, 2004; Passler et al., 2009). A bibliografia disponível refere a infecção pelo BVDV em animais pertencentes às famílias *Bovidae*, *Camelidae*, *Cervidae*, *Giraffidae*, *Tragulidae* e *Suidae* (Tabela 1) (Carman et al., 2005; Kadir et al., 2008; Potgieter, 2004; Uttenthal et al., 2006; Van Campen et al., 2001).

Dentro da ordem *Artiodactyla*, o BVDV atravessa frequentemente a barreira inter-espécies (Krey, Moussay et al., 2006).

Tabela 1. Espécies em que se encontra descrita a infecção pelo BVDV.

Nome comum	Família	Espécie	Referência
Alce	<i>Cervidae</i>	<i>Alces alces</i>	(Kocan, Franzmann, Waldrup, & Kubat, 1986)
Alpaca	<i>Camelidae</i>	<i>Vicugna pacos</i>	(Carman et al., 2005; Kim et al., 2009)
Antilocapra	<i>Antilocapridae</i>	<i>Antilocapra americana</i>	(Stauber, Autenrieth, Markham, & Whitbeck, 1980; Vilcek, Ridpath, Van Campen, Cavender, & Warg, 2005)
Bauala	<i>Bovidae</i>	<i>Tragelaphus scriptus</i>	(Potgieter, 2004)
Bisonte americano	<i>Bovidae</i>	<i>Bison bison</i>	(Sausker & Dyer, 2002)
Bisonte europeu	<i>Bovidae</i>	<i>Bison bonasus</i>	(Mishra et al., 2008)
Bongo	<i>Bovidae</i>	<i>Tragelaphus euryceros</i>	(Vilcek & Nettleton, 2006)
Búfalo africano	<i>Bovidae</i>	<i>Sincerus caffer</i>	(Potgieter, 2004)
Búfalo asiático	<i>Bovidae</i>	<i>Bubalus bubalis</i>	(Craig et al., 2008; Potgieter, 2004)
Cabra	<i>Bovidae</i>	<i>Capra hircus</i>	(Belknap, Collins, Larsen, & Conrad, 2000)
Camurça	<i>Bovidae</i>	<i>Rupicapra rupicapra</i>	(Vilcek & Nettleton, 2006)
Corço	<i>Cervidae</i>	<i>Capreolus capreolus</i>	(Potgieter, 2004)
Dromedário	<i>Camelidae</i>	<i>Camelus dromedarius</i>	(Yousif, Braun, Saber, Aboelleil, & Chase, 2004)
Elande	<i>Bovidae</i>	<i>Taurotragus oryx</i>	(Potgieter, 2004)
Gamo	<i>Cervidae</i>	<i>Dama dama</i>	(Van Campen et al., 2001)
Girafa	<i>Giraffidae</i>	<i>Giraffa camelopardus</i>	(Potgieter, 2004)
Gnu	<i>Bovidae</i>	<i>Connochaetes taurinus</i>	(Potgieter, 2004)
Iaque	<i>Bovidae</i>	<i>Bos poephagus grunniens</i>	(Mishra et al., 2008)
Kudu	<i>Bovidae</i>	<i>Tragelaphus streptoceros</i>	(Potgieter, 2004)
Lama	<i>Camelidae</i>	<i>Lama glama</i>	(Belknap et al., 2000)
Niala	<i>Bovidae</i>	<i>Tragelaphus angasii</i>	(Potgieter, 2004)
Ovelha	<i>Bovidae</i>	<i>Ovis aries</i>	(Murphy, 1999)
Porco	<i>Suidae</i>	<i>Sus scrofa</i>	(Belknap et al., 2000; Kadir et al., 2008)
Pudu do Sul	<i>Cervidae</i>	<i>Pudu puda</i>	(Uttenthal et al., 2006; Vilcek & Nettleton, 2006)
Rena	<i>Cervidae</i>	<i>Rangifer tarandus</i>	(Houe, 1999)
Trágulo malaio	<i>Tragulidae</i>	<i>Tragulus javanicus</i>	(Uttenthal et al., 2005)

Tabela 1. Espécies em que se encontra descrita a infecção pelo BVDV (continuação).

Nome comum	Família	Espécie	Referência
Vaca	<i>Bovidae</i>	<i>Bos taurus</i>	(Potgieter, 2004)
Veado vermelho	<i>Cervidae</i>	<i>Cervus elaphus</i>	(Potgieter, 2004)
Veado-de-cauda-branca	<i>Cervidae</i>	<i>Odocoileus virginianus</i>	(Passler et al., 2009)
Veado-mula	<i>Cervidae</i>	<i>Odocoileus hemionus</i>	(Van Campen et al., 2001)

Transmissão do BVDV intra-manada

O vírus da Diarreia Bovina Viral pode ser transmitido dos animais infectados para os susceptíveis através de várias vias, nas quais se incluem a ingestão e a inalação de matéria contaminada com secreções oculares e nasais, saliva, urina ou fezes de animais infectados (Harkness & Van Der Lugt, 1994; Houe, 1999; Lindberg & Houe, 2005; Potgieter, 2004). O vírus pode ainda estar presente no sêmen de touros infectados, levando à sua transmissão através do coito e da inseminação artificial (Carter, 2004). A infecção transplacentária é frequente, podendo levar ao nascimento de animais imunotolerantes, persistentemente infectados (PI), que excretam continuamente o vírus para o ambiente (Carter, 2004; Grooms & Keilen, 2002; Harkness & Van Der Lugt, 1994).

Os animais persistentemente infectados constituem a principal fonte de transmissão do vírus, uma vez que libertam continuamente, durante toda a sua vida, elevadas quantidades deste para o ambiente (Houe, 1999; Lindberg & Houe, 2005; Potgieter, 2004). O sangue destes animais pode ter até 10^7 doses infectantes para cultura de tecidos (TCID) por mililitro. Apresentam, ainda, um elevado número de partículas virais nas suas secreções nasais, saliva, lágrimas, sêmen, leite, urina e fezes. Os animais com infecções primárias (agudas) pós-natais são apenas transitoriamente infectados (TI) (Potgieter, 2004). Estes animais excretam o vírus em quantidade inferior em relação aos PI, e apenas durante alguns dias (Houe, 1999).

Em termos gerais, os animais persistentemente infectados desempenham um papel substancialmente mais significativo na transmissão do vírus, que os animais TI (Lindberg & Houe, 2005). Em condições naturais, o contacto directo com um animal PI é o modo mais eficiente de transmissão do vírus, e uma hora de contacto directo, com possibilidade de contacto nariz-a-nariz, é suficiente para que ocorra transmissão do BVDV. O contacto directo com animais TI também pode resultar na transmissão do vírus, mas de forma menos eficiente (Figura 3) (Houe, 1999).

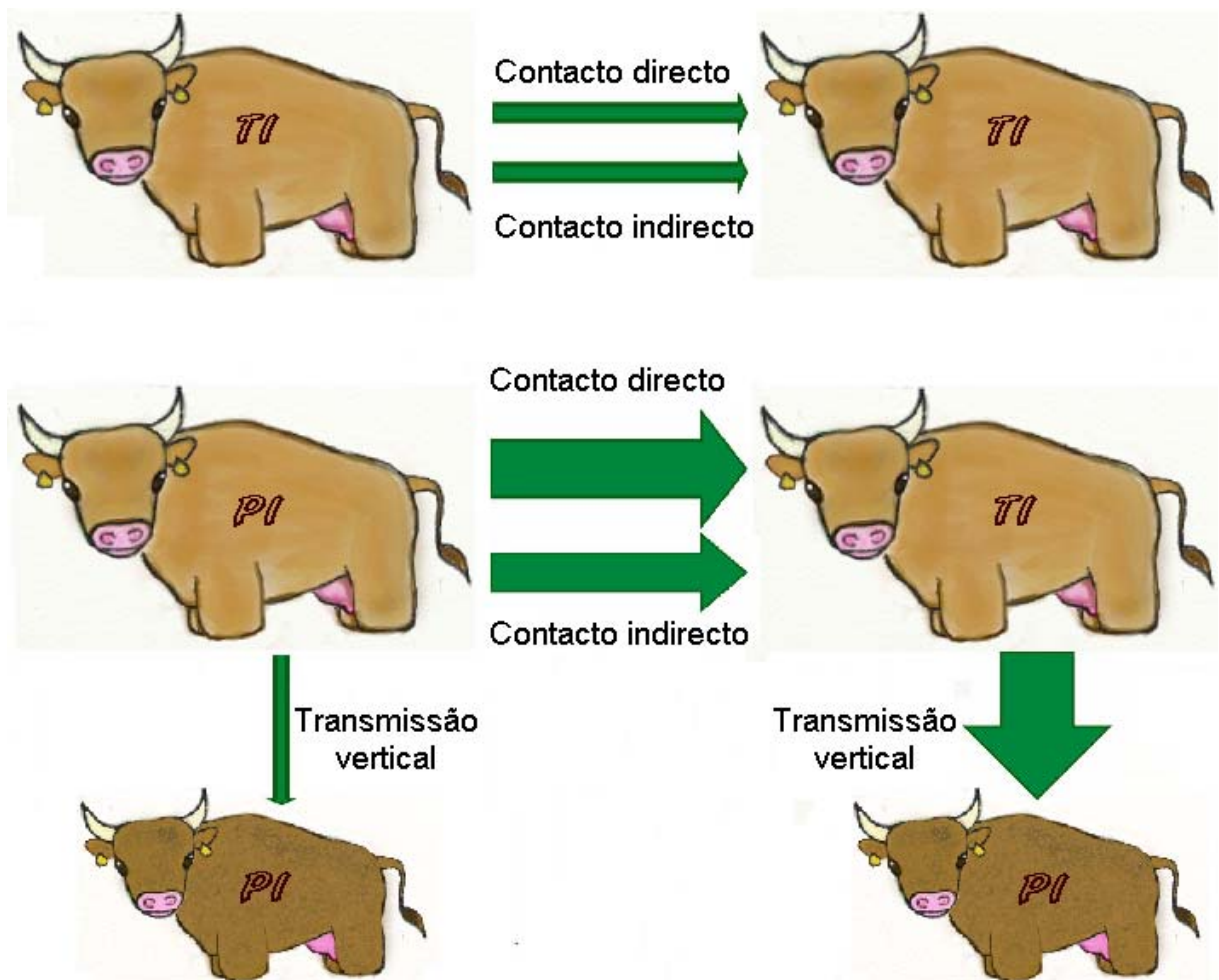


Figura 3. Dinâmica de transmissão do BVDV (adaptado de Lindberg & Houe, 2005).

Legenda: TI, Transitoriamente infectado; PI, Persistentemente infectado; A espessura das setas indica a importância relativa da via de transmissão.

Os resultados obtidos num estudo realizado por Niskanen, Lindberg & Traven (2002), com animais transitoriamente infectados, sugerem que a disseminação da infecção pelo BVDV não é provável quando estes animais constituem a única fonte de propagação do vírus.

Consequentemente, os animais TI tendem a ser considerados como hospedeiros fundo-de-saco do vírus (Lindberg & Houe, 2005; Niskanen & Lindberg, 2003). A exceção aplica-se no caso das fêmeas infectadas no início da gestação, uma vez que a probabilidade de transmissão vertical resultante de uma infecção transitória é muito mais elevada que a probabilidade de transmissão horizontal. De facto, a maioria dos novos casos de infecção persistente detectados numa manada infectada serão consequência de infecções transitórias em fêmeas que apresentam uma resposta imunitária normal. A probabilidade de transmissão vertical em fêmeas PI é praticamente igual a 1, considerando-se que estas darão sempre origem a descendência PI (Lindberg & Houe, 2005).

O principal modo de transmissão horizontal em manadas infectadas é, portanto, o contacto directo e indirecto de animais susceptíveis com animais PI (Lindberg & Houe, 2005). Apesar de existirem alguns relatos que sugerem que o vírus pode persistir em manadas sem animais

PI (Moen, Sol, & Sampimon, 2005), a disseminação do vírus praticamente pára quando estes são removidos, o que torna possível a erradicação do BVDV da manada sem que seja necessário adoptar medidas especiais para verificar se os animais com infecções transitórias ainda estão a propagar o vírus (Lindberg & Houe, 2005). Tipicamente, verifica-se que praticamente nenhum dos animais nascidos após a remoção do último animal persistentemente infectado apresenta anticorpos contra o BVDV (Lindberg & Houe, 2005).

A probabilidade de transmissão do BVDV por outras vias que não o contacto nariz-a-nariz encontra-se dependente da dose e da via de infecção. Por sua vez, a dose depende da taxa de inactivação do agente (duração do período de infecciosidade) (Lindberg & Houe, 2005). O BVDV é estável a temperaturas inferiores a 10°C, e a valores de pH entre 3 e 9, podendo sobreviver no ambiente durante 3 horas a 35°C, 3 a 7 dias a 20°C e três semanas a 5°C (Potgieter, 2004). A aplicação de temperaturas elevadas ou de desinfectantes comuns (e.g., clorohexidina, fenóis, iodóforos, aldeídos e hipocloritos) resultam na inactivação do vírus (B. P. Smith, 2002; Williams & Barker, 2001). Não obstante a pouca estabilidade do vírus no ambiente, devido às doses substanciais de vírus eliminadas pelos PI, pode ocorrer a transmissão aerógena do BVDV entre edifícios (Gard, Givens, & Stringfellow, 2007; Harkness & Van Der Lugt, 1994; Lindberg & Houe, 2005). Adicionalmente, os fluidos fetais podem ser infecciosos, e os equipamentos utilizados em animais PI e as baias onde estes estiveram alojados podem, por um período limitado de tempo, albergar uma dose suficiente de vírus viável para provocar a seroconversão em animais susceptíveis (Lindberg & Houe, 2005; Niskanen & Lindberg, 2003).

Encontram-se demonstradas várias vias de transmissão indirecta do vírus da Diarreia Bovina Viral, como a reutilização de agulhas hipodérmicas, arganéis e luvas de palpação rectal, ou a utilização de vacinas vivas ou contaminadas (Houe, 1999; Niskanen & Lindberg, 2003). Também é possível a transmissão mecânica do vírus por insectos sugadores de sangue (Houe, 1999; Potgieter, 2004).

Transmissão do BVDV entre manadas

O vírus da Diarreia Bovina Viral é geralmente introduzido numa manada susceptível através da compra de animais PI ou de fêmeas gestantes portadoras de fetos PI (Houe, 1999). É possível que cerca de 90% da manada seja infectada pelo vírus, num espaço de apenas três a quatro meses após o nascimento de um animal persistentemente infectado (Lindberg & Houe, 2005). Contudo, foi demonstrado que a infecção é introduzida muito mais frequentemente do que pode ser explicado pelo risco de adquirir animais PI, encontrando-se descritos casos de novas infecções em manadas onde não houve introdução de animais. O contacto com animais de outras manadas, como o pastoreio a curta distância, as fugas, feiras de gado, etc., também pode revelar-se importante na transmissão do BVDV (Houe, 1999).

As matérias criopreservadas, como o sémen e os embriões, constituem outra fonte de transmissão do vírus (Bielanski, Algire, Lalonde, & Nadin-Davis, 2009; Givens & Waldrop, 2004; Lindberg & Houe, 2005). O BVDV é eliminado no sémen, tanto de touros PI (10^7 TCID₅₀/ml) como de touros TI (5 a 75 TCID₅₀/ml) (Houe, 1999). O vírus sobrevive ao processo de criopreservação do sémen, podendo ser transmitido a fêmeas seronegativas por inseminação artificial (Marley et al., 2009). A dose infectante mínima determinada para esta via de transmissão é de 25-50 TCID₅₀/ml (Bielanski et al., 2009). O BVDV também pode estar presente no leite utilizado nos diluidores de sémen à base de leite. Todavia, o tratamento térmico apropriado deste leite elimina o risco de transmissão do vírus (Marley et al., 2009).

O vírus da Diarreia Bovina Viral pode ser introduzido nos sistemas de produção de embriões *in vivo* em associação com os oócitos, células do *cumulus oophorus*, fluido folicular, células do oviducto, sémen, fluidos uterinos, soros usados nos meios para lavagem uterina e, ainda, com o azoto líquido em que os embriões são preservados. Os embriões resultantes da produção *in vitro* podem ser contaminados com o BVDV através dos oócitos, células do *cumulus oophorus*, fluido folicular, células do oviducto, sémen, soros usados nos meios de cultura e do azoto líquido em que os embriões são preservados (Givens & Waldrop, 2004). O BVDV é um de doze agentes patogénicos dos embriões de espécies pecuárias classificados como “categoria 3” pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). Os agentes patogénicos pertencentes a esta categoria são aqueles agentes para os quais os resultados de estudos preliminares indicam que o risco de transmissão é negligenciável - desde que os embriões produzidos *in vivo* sejam manipulados de acordo com o Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (*International Embryo Transfer Society* (IETS)) – sendo necessários mais dados experimentais, *in vitro* e *in vivo*, para substanciar os estudos preliminares (Gard et al., 2009). O BVDV foi originalmente classificado como pertencendo à categoria 3 com base num estudo realizado por Singh, Eaglesome, Thomas, Papp-Vid, & Hare (1982), que validava a eficácia dos procedimentos de lavagem na remoção do vírus, em embriões produzidos *in vivo*, artificialmente expostos a um isolado citopático de BVDV (Gard et al., 2009; Singh et al., 1982).

Numa tentativa de simular o pior cenário possível de exposição viral de embriões, Gard et al. (2009), expuseram embriões produzidos, tanto *in vitro* como *in vivo*, a uma estirpe de BVDV de elevada afinidade, processando-os depois, de acordo com as recomendações da IETS. Após a aplicação dos rigorosos procedimentos de lavagem, os embriões apresentavam cerca de 100 a 400 doses infectantes para 50% das culturas de células (CCID₅₀) de vírus, por embrião (Gard et al., 2009). Embora estes valores sejam relativamente baixos, a quantidade de vírus necessária para que ocorra uma infecção intra-uterina ainda não se encontra determinada e pode diferir de estirpe para estirpe, pelo que continua a existir o risco de transmissão do BVDV por esta via (Bielanski et al., 2009; Gard et al., 2009).

O vírus adere mais firmemente a embriões fertilizados *in vitro* do que a embriões fertilizados *in vivo* (Bielanski, Lutze-Wallace, & Nadin-Davis, 2003).

Os embriões produzidos *in vivo*, colhidos de dadoras persistentemente infectadas e transferidos para receptoras seropositivas, ou mesmo seronegativas, não transmitem necessariamente o vírus ao feto. A infecção das receptoras via transferência de embriões não leva forçosamente a mortalidade embrionária ou à transmissão do vírus aos fetos sobreviventes. Adicionalmente, na maioria dos casos em que a infecção pelo BVDV ocorre através do sêmen, ou no período peri-inseminação, o resultado será, ou a perda da gestação, ou o nascimento de um animal normal, não-virêmico. É raro que as fêmeas infectadas numa fase muito precoce da gestação dêem à luz animais seropositivos ou persistentemente infectados (Bielanski et al., 2009).

Por fim, a presença do vírus da Diarreia Bovina Viral em subprodutos de origem biológica, como o soro fetal de bovino (FCS), e a utilização destes produtos para a produção de vacinas vivas, proporciona vias adicionais para a disseminação do vírus entre manadas. Os produtos biológicos (vacinas, embriões e sêmen) contaminados com o BVDV apresentam um enorme potencial para transmitir o vírus, não só entre manadas “vizinhas”, como entre regiões, países, continentes. As vacinas ou sêmen de um único lote/touro poderão ser utilizados em vários animais, de diversas manadas, com graves consequências (Lindberg & Houe, 2005).

Os hospedeiros silvestres/selvagens do vírus da Diarreia Bovina Viral poderão agir como reservatórios do vírus, podendo ser responsáveis pela re-introdução do BVDV em manadas em que este foi erradicado (Passler et al., 2009). A transmissão inter-espécies é, teoricamente, possível em áreas onde ungulados selvagens partilham pastos e épocas de reprodução com bovinos domésticos. Considera-se que a presença de hospedeiros selvagens do BVDV pode mesmo impossibilitar a erradicação da Diarreia Bovina Viral (Lindberg & Houe, 2005).

Fisiopatologia

Infecção primária pós-natal

Como foi dito anteriormente, o contacto com um animal PI é o modo mais eficiente de transmissão do vírus da Diarreia Bovina Viral, e uma hora de contacto directo, com possibilidade de contacto nariz-a-nariz, é suficiente para que ocorra transmissão do vírus (Houe, 1999).

A adesão do vírus às células-alvo envolve a interacção das glicoproteínas E^{ms} e E2 com glicosaminoglicanos (e.g., sulfato de heparano) e proteínas membranárias, respectivamente (Krey, Himmelreich et al., 2006; Lecot et al., 2005). Os receptores celulares do BVDV incluem o CD46 e o receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-R) (Lecot et al., 2005). O CD46 pertence à família das proteínas reguladoras da activação do complemento, agindo como co-factor para o factor I, uma serina-protease plasmática que cliva os factores C3b e C4b do complemento, depositados nos tecidos, protegendo, assim, as células do hospedeiro de danos mediados pelo complemento (Krey, Himmelreich et al., 2006; Maurer et al., 2004). O CD46 é expressado nos linfócitos T, linfócitos B, monócitos, granulócitos, células *Natural killer* (NK), plaquetas, fibroblastos, células endoteliais e células epiteliais, mas não nos eritrócitos (Tizard, 2004). O domínio extracelular do CD46 consiste numa estrutura semelhante a uma antena, constituída por quatro módulos de proteínas de controlo do complemento, ou CCP (CCP1 a CCP4), que desempenham diferentes funções (Krey, Himmelreich et al., 2006; Maurer et al., 2004). A proteína de controlo de complemento CCP1 é essencial para a adesão celular do BVDV (Krey, Himmelreich et al., 2006). A ligação dos factores C3b e C4b do complemento ocorre ao nível da CCP2, da CCP3 e da CCP4 (Maurer et al., 2004). Não existem evidências experimentais de que o receptor LDL desempenhe um papel decisivo na invasão celular pelo vírus (Krey, Moussay et al., 2006).

Uma vez adsorvido ao receptor celular, o vírus sofre endocitose mediada por clatrina e é transportado para um compartimento endossómico (Krey, Himmelreich et al., 2006; Lecot et al., 2005). A entrada do BVDV na célula pressupõe um passo de activação, que ocorre durante a endocitose, e que parece envolver a destabilização do virião, através da quebra de pontes dissulfureto que ligam as glicoproteínas do envelope viral (Krey, Himmelreich et al., 2006; Krey, Thiel, & Rumenapf, 2005). Esta destabilização torna o virião fusogénico quando sujeito ao baixo pH endossómico, o que permite a fusão entre o envelope e a membrana do endossoma, com a consequente libertação do ARN viral para o citoplasma, onde ocorre a replicação do vírus (Krey, Himmelreich et al., 2006; Krey et al., 2005; Pankraz et al., 2005).

Numa primeira fase, o BVDV replica na mucosa nasal e nas tonsilas (Potgieter, 2004). Posteriormente, o vírus replica nos linfonodos regionais, utilizando os leucócitos para a sua disseminação aos restantes órgãos e tecidos, através do sistema linfático (Lee, Nanduri,

Pharr, Stokes, & Pinchuk, 2009; Potgieter, 2004). As tonsilas, o timo e o íleo apresentam, geralmente, os títulos virais mais elevados (Potgieter, 2004).

Ambos os biótipos do vírus exercem efeito imunossupressor, ao modularem, tanto a imunidade inata, como a imunidade adquirida do hospedeiro (Peterhans, Jungi, & Schweizer, 2003; Pinchuk et al., 2008). O BVDV infecta células *pivot* no controlo da resposta imunitária, entre as quais se incluem granulócitos, monócitos, macrófagos, células mielóides apresentadoras de antígeno, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, e linfócitos B (Chase, Elmowalid, & Yousif, 2004; Lee et al., 2009). A função das células apresentadoras de antígeno e a produção de interferão (IFN) são particularmente afectadas (Pinchuk et al., 2008).

A Tabela 2 apresenta um resumo dos efeitos imunossupressores mais significativos do BVDV, e das suas consequências.

Tabela 2. Efeitos do vírus da Diarreia Bovina Viral sobre o sistema imunitário (adaptado de Chase et al., 2004).

Alterações celulares e/ou de citocinas	Efeito sobre o sistema imunitário	Efeito na resposta do animal à doença
Imunidade Inata ↓ quimiotaxia ↓ expressão de receptores Fc, CD14 e complemento ↓ fagocitose ↓ níveis de TNF-α ↑ níveis de inibidores da IL-1 ↓ produção de ião superóxido ↓ actividade microbica ↓ produção de IFN-α (BVDV ncp) ↑ produção de IFN-α (BVDV cp)	↓ da migração de neutrófilos ↓ da fagocitose ↓ fagocitose de microrganismos ↓ produção de citocinas inflamatórias ↓ produção de citocinas inflamatórias e dos linfócitos T ↑ crescimento bacteriano ↓ resposta antiviral ↑ resposta antiviral	↑ infecções bacterianas secundárias ↑ infecções bacterianas secundárias ↑ infecções bacterianas secundárias ↓ resposta imunitária inata e adquirida ↓ resposta imunitária inata e adquirida ↑ infecções bacterianas secundárias Evasão ao sistema imunitário e infecção viral Apoptose e morte das células infectadas
Imunidade adquirida ↓ expressão de MHC II ↓ expressão de MHC I (BVDV ncp) ↑ activação de linfócitos Th1 (BVDV cp) ↑ activação de linfócitos Th2 (BVDV ncp)	↓ apresentação de antígenos ↓ actividade dos linfócitos citotóxicos ↑ resposta dos linfócitos citotóxicos ↑ número de linfócitos T de memória ↑ activação dos linfócitos B	↓ resposta imunitária adquirida ↑ evasão ao sistema imunitário e infecção viral ↑ resposta protectora a longo-prazo ↑ produção de anticorpos ↓ resposta imunitária mediada por células

Legenda: ↑, aumento; ↓, diminuição; BVDV cp, biótipo citopático; BVDV ncp, biótipo não-citopático; CD14, receptor para lipolissacarídeo (LPS); Fc, fragmento da região constante das imunoglobulinas; IFN- α, interferão alfa; IL-1, interleuquina 1; MHC I, complexo maior de histocompatibilidade classe I; MHC II, complexo maior de histocompatibilidade classe II; Th1, T helper 1; Th2, T helper 2; TNF-α, factor de necrose tumoral alfa.

A infecção pelo vírus da Diarreia Bovina Viral afecta a função dos neutrófilos, levando à diminuição da actividade microbida e quimiotática destas células (Chase et al., 2004; Peterhans et al., 2003). Nestas células, a citotoxicidade mediada por células, dependente de anticorpos, encontra-se igualmente deprimida (Chase et al., 2004).

A infecção *in vitro* de monócitos, com uma estirpe citopática do vírus, diminui a capacidade destas células para fagocitarem e apresentarem antígenos, comprometendo a sua função enquanto estimuladores da activação dos linfócitos T CD4⁺ e da produção de células-memória (Lee et al., 2009). Os monócitos infectados tornam-se apoptóticos e produzem factores solúveis, que induzem a apoptose de monócitos e linfócitos não-infectados. A infecção *in vivo* com uma estirpe virulenta de BVDV resultou num decréscimo de 30 a 70% no número de monócitos (Chase et al., 2004). Ao alterar os níveis de expressão de várias proteínas relacionadas com respostas imunitárias, como a adesão celular, a apoptose, e a captura, processamento e apresentação de antígeno, assim como de outras proteínas de fase aguda, o BVDV cp poderá comprometer gravemente a função imunitária. O aumento da expressão das proteínas associadas à resposta de fase aguda e à adesão celular, a par com o decréscimo na expressão de proteínas envolvidas na captura, processamento e apresentação de antígeno, sugere que a infecção com estirpes citopáticas do vírus promove a migração, diferenciação e activação dos monócitos, ao mesmo tempo que inibe a apresentação de antígenos virais a linfócitos imunocompetentes, sobretudo linfócitos Th1 e linfócitos T-reguladores. O resultado é uma resposta inflamatória descontrolada, mediada por macrófagos activados, e a disseminação do vírus pelo organismo do hospedeiro (Lee et al., 2009).

Independentemente do biótipo considerado, a infecção *in vivo* ou *in vitro* pelo vírus da Diarreia Bovina Viral acarreta uma redução na actividade macrofágica (Chase et al., 2004). A actividade fagocítica dos macrófagos alveolares encontra-se deprimida, assim como a actividade microbida, a produção de factores quimiotáticos, e a expressão dos receptores para a fracção Fc das imunoglobulinas e para as proteínas do complemento (Chase et al., 2004; Peterhans et al., 2003). Observa-se, ainda, a diminuição da formação de anião superóxido e da produção do factor de necrose tumoral alfa (TNF- α), em resposta ao LPS. Só o biótipo não-citopático do BVDV promove a produção de óxido nítrico (NO) em resposta ao LPS. Tanto a diminuição na síntese de anião superóxido e TNF- α , como o aumento da síntese de NO poderão contribuir para o efeito imunossupressor do vírus da Diarreia Bovina Viral (Peterhans et al., 2003). Adicionalmente, a infecção de macrófagos pelo BVDV induz outros efeitos imunossupressores, como a estimulação da síntese de prostaglandina E2, a indução de inibidores da interleucina 1 (IL-1) e a inibição da quimiotaxia induzida por citocinas (Chase et al., 2004; Peterhans et al., 2003). A libertação de factores solúveis por macrófagos infectados com o vírus citopático promove a apoptose de macrófagos não-infectados e de células epiteliais. É possível que a patologia dos tecidos linfóides associada à

infecção por estirpes altamente virulentas do BVDV esteja directamente relacionada com a indução da apoptose por estes factores, e não com a replicação viral (Chase et al., 2004). Chase et al. (2004) observaram que, enquanto a infecção de macrófagos com estirpes não-citopáticas do vírus pode causar reduções de 30% a 70% na expressão de MHC I, a infecção com estirpes citopáticas do BVDV aumenta a expressão de MHC I nestas células.

Vários estudos efectuados, *in vitro* e *in vivo*, indicam que a infecção de células com estirpes não-citopáticas do vírus da Diarreia Bovina Viral não induz uma elevação significativa na produção de IFN tipo I, inibindo a apoptose induzida por dsARN e a síntese de ARN mensageiro (mARN) do IFN α/β (Baigent, Goodbourn, & McCauley, 2004; Chase et al., 2004; Glew et al., 2003; Peterhans et al., 2003). Contudo, existem estudos, *in vivo*, que evidenciam que a infecção com estirpes ncp do BVDV gera fortes respostas do tipo IFN- α , - β e - γ (Charleston et al., 2002; Chase et al., 2004; Muller-Doblies et al., 2004; Smirnova et al., 2008). Os resultados destes estudos sugerem que a imunossupressão causada pelo BVDV ncp poderá não estar associada a baixos níveis de IFN, o que não exclui na totalidade a influência que a inibição da síntese de interferão, no período inicial da infecção, possa ter sobre a resposta imunitária final (Chase et al., 2004). Ambos os biótipos do vírus são capazes de perturbar a síntese de IFN- β . A proteína viral N^{pro} encontra-se no centro desta perturbação, induzindo a poliubiquitinação e promovendo a degradação mediada por endossomas do factor regulador de interferão 3 (IRF-3), um factor de transcrição celular fulcral no controlo da síntese de IFN (Baigent et al., 2004; Chen et al., 2007).

Num estudo realizado por Archambault, Beliveau, Couture, & Carman (2000), a infecção com uma estirpe altamente virulenta de BVDV-2 ncp causou uma diminuição da expressão de MHC II e B7, duas moléculas importantes para a apresentação de antígenos, nas células mononucleares do sangue periférico.

Glew et al. (2003) determinaram que, apesar de sensíveis à infecção por estirpes citopáticas e não-citopáticas do BVDV, as células dendríticas não são afectadas na sua capacidade para estimular a activação dos linfócitos T CD4⁺ e a produção de células-memória. Adicionalmente, as células dendríticas não parecem ser susceptíveis ao efeito citopático causado pelo BVDV cp (Glew et al., 2003).

O efeito da infecção pelo vírus da Diarreia Bovina Viral sobre o número de linfócitos T circulantes depende da estirpe considerada, variando entre uma linfopenia ligeira (10-20%) e uma linfopenia grave (50% a 60% de redução no número de linfócitos T em circulação). As principais repercussões da infecção observam-se nos linfócitos foliculares e tímicos, com depleção dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ no timo, e uma redução do número global de linfócitos T no baço. À observação microscópica, verifica-se uma acentuada depleção de linfócitos T nos folículos linfóides das tonsilas, linfonodos e placas de Peyer, nos casos de infecção por estirpes não-citopáticas, altamente virulentas, do vírus. Apesar da redução do número de linfócitos T CD8⁺ ser mais significativa que a de linfócitos T CD4⁺, só a depleção destes

últimos contribui para o aumento do período de eliminação do vírus para o meio ambiente (Chase et al., 2004).

O principal efeito da infecção pelo BVDV sobre os linfócitos B ocorre ao nível dos linfócitos B foliculares, com depleção destas células nos folículos linfóides dos linfonodos, em infecções com estirpes altamente virulentas de BVDV ncp, e nas placas de Peyer, em infecções por BVDV altamente virulento (Chase et al., 2004).

A infecção pelo vírus da Diarreia Bovina Viral tipo 2 encontra-se associada a trombocitopénia e a alterações da função plaquetária (Walz et al., 2001). Ambas poderão contribuir para as hemorragias observadas nos animais infectados pelo BVDV-2 (Wood et al., 2004). Apesar do mecanismo responsável pela diminuição da resposta plaquetária ainda não ser conhecido, é pouco provável que esta se deva à interacção directa entre o vírus e as plaquetas. O vírus foi detectado em megacariócitos, através de técnicas de imunohistoquímica e de imunofluorescência, e é possível que a infecção destas células resulte, não só na associação do vírus com as plaquetas, como na alteração da função plaquetária. A infecção dos megacariócitos poderá alterar a trombopoiese e a megacariocitopoiese, levando à redução do número de plaquetas em circulação e ao envelhecimento do *pool* circulante de plaquetas. As plaquetas envelhecidas são menos sensíveis aos estímulos agregatórios, pelo que poderá ser esta a causa da disfunção plaquetária observada nos animais infectados pelo BVDV-2 (Walz et al., 2001).

Ambas as divisões do sistema imunitário (imunidade inata e imunidade adquirida) são, ainda, imaturas num bovino recém-nascido, pelo que este se encontra especialmente vulnerável durante as primeiras semanas de vida (Endsley, Roth, Ridpath, & Neill, 2003). Adicionalmente, a barreira transplacentária não permite a passagem de anticorpos, pelo que o vitelo nasce agamaglobulinémico e fortemente dependente da ingestão de anticorpos colostrais para a sua sobrevivência (Endsley et al., 2003; Smirnova et al., 2008). Estes anticorpos duram cerca de 8 meses num animal não-PI e aproximadamente 3 meses num animal PI (Mockeliuniene, Salomskas, Mockeliunas, & Petkevicius, 2004). Enquanto se encontram em circulação, estes anticorpos bloqueiam a resposta humoral do vitelo ao BVDV, mas não impedem a formação de células T (CD4+, CD8+ e $\gamma\delta$) e B de memória. Isto permite que o vitelo se torne resistente à infecção pelo BVDV, mesmo depois de perder os anticorpos maternos (Endsley et al., 2003).

A infecção de animais imunocompetentes pelo vírus da Diarreia Bovina Viral é transitória e gera uma rápida resposta do sistema imunitário inato, seguida de uma resposta imunitária adaptativa, prolongada no tempo (Muller-Doblies et al., 2004). A infecção transitória de vitelos com estirpes não-citopáticas do vírus causa uma virémia transitória, com excreção nasal do vírus, que se resolve cerca de 12 a 14 dias após infecção. Em contraste, a infecção com estirpes citopáticas homólogas resulta numa virémia indetectável, com baixos títulos virais nas secreções nasais (Brackenbury, Carr, & Charleston, 2003).

A resposta proliferativa dos linfócitos T desenvolve-se de forma relativamente lenta, em comparação com outros vírus, ocorrendo mais precocemente nas infecções por BVDV cp (3 a 4 semanas após infecção) que nas infecções por BVDV ncp (6 a 8 semanas após infecção) (Brackenbury et al., 2003; Chase et al., 2004; Glew et al., 2003). A capacidade que o vírus apresenta para comprometer a actividade dos monócitos, e possivelmente dos linfócitos B, na apresentação de antígenos poderá contribuir para o atraso no desencadeamento desta resposta (Glew et al., 2003).

Animais infectados com estirpes citopáticas do vírus apresentam respostas Th1 aproximadamente duas a cinco vezes superiores, quando comparados a animais infectados com estirpes não-citopáticas, indicando que, enquanto as estirpes cp geram preferencialmente respostas Th1 (com activação de linfócitos T citotóxicos CD8+), as estirpes ncp tendem a deslocar a resposta imunitária de Th1 (celular) para Th2 (humoral). A activação preferencial dos linfócitos Th2 resulta na produção de elevados níveis de anticorpos (Chase et al., 2004).

A glicoproteína estrutural E2 é o componente mais imunogénico do BVDV, promovendo a síntese de anticorpos neutralizantes (Chase et al., 2004; Toth, Nettleton, & McCrae, 1999). A glicoproteína E^{ms} origina igualmente a produção de níveis significativos de anticorpos, que apresentam, contudo, uma actividade neutralizante limitada. As restantes proteínas estruturais do virião, E1 e C, apresentam potencial imunogénico nulo ou baixo, respectivamente. Existem ainda, duas proteínas não-estruturais altamente imunogénicas, as proteínas NS2-3 e NS3 (Chase et al., 2004).

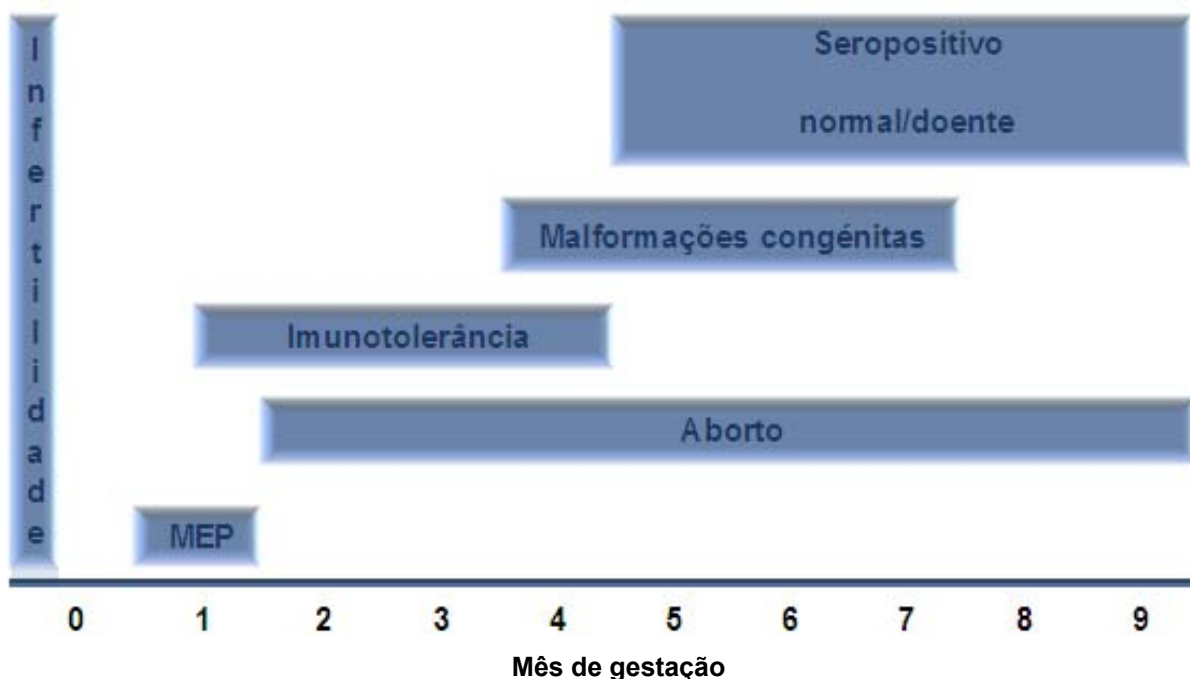
Existem evidências de que a imunossupressão causada pela infecção com o vírus da Diarreia Bovina Viral contribui para facilitar e/ou potenciar a infecção por outros microrganismos patogénicos, entre os quais figuram patógenos causadores de doença respiratória nos bovinos (e.g., PIV-3, BHV-1, BRSV, *Mannheimia haemolytica*) (Booker et al., 2008; Brackenbury et al., 2003; Fulton et al., 2000; Peterhans et al., 2003). A infecção de macrófagos alveolares pelo vírus reduz a actividade fagocítica e microbicida, a expressão de receptores para complemento e para a região Fc dos anticorpos, e a secreção de factores quimiotáticos (Welsh, Adair, & Foster, 1995). Adicionalmente, o BVDV bloqueia a regulação positiva, induzida por LPS, da expressão do gene TAP e da produção de lactoferrina pelas células epiteliais da traqueia. A infecção aguda causa, ainda, neutropénia, o que pode aumentar a susceptibilidade dos pulmões a infecções bacterianas (Al-Haddawi, Mitchell, Clark, Wood, & Caswell, 2007).

O vírus apresenta, também, tropismo para o ovário, testículo e sistema nervoso central (Blas-Machado, Saliki, Duffy, & Caseltine, 2004; Givens, Riddell, Edmondson et al., 2009; Grooms, Brock, & Ward, 1998).

Infecção pré-natal

Apesar de receber a denominação de vírus da Diarreia Bovina Viral, o BVDV afecta essencialmente o aparelho reprodutor (Carter, 2004). Os efeitos do vírus sobre a reprodução são diversos, dependendo do momento da infecção, da imunocompetência do feto, do biótipo viral envolvido e da virulência do vírus (Gráfico 1) (Grooms, 2004).

Gráfico 1. Possíveis consequências da infecção pelo vírus da Diarreia Bovina Viral sobre a reprodução (adaptado de Grooms, 2004).



Legenda: MEP, morte embrionária precoce

A influência que o BVDV exerce sobre a reprodução e a fertilidade torna-se evidente, mesmo antes da concepção (Grooms, 2004).

Nos machos, a infecção aguda pelo BVDV dá origem a orquites crónicas, que podem durar, pelo menos, 2,75 anos, período durante o qual o vírus é eliminado no sémen, podendo ser transmitido a fêmeas seronegativas por cobrição natural ou por inseminação artificial (Givens, Riddell, Edmondson et al., 2009; Grooms, 2004; Marley et al., 2009). Os machos PI eliminam, igualmente, o vírus no sémen (Houe, 1999).

Nas vacas PI, os ovários encontram-se, frequentemente, hipoplásicos e o número de folículos antrais é significativamente reduzido, quando em comparação com vacas saudáveis (Grooms, 2004). Nas fêmeas não-PI, a infecção aguda pelo vírus durante o período crítico de crescimento dos folículos pré-ovulatórios origina diversos graus de necrose das células da granulosa, que podem resultar em disfunção ovária (e.g., atrasos no crescimento folicular, ovulação atrasada, anovulação) (McGowan et al., 2003). Também foram descritas lesões de ooforite linfocítica intersticial crónica em amostras de ovário, colhidas até 60 dias pós-infecção (Grooms et al., 1998). Adicionalmente, os vírus pertencentes ao biótipo não-citopático exibem

a capacidade de perturbar a secreção ovárica de esteróides, prolongando a secreção de estradiol e adiando o início da secreção lútea de progesterona, mesmo perante um perfil “normal” de secreção de LH durante a fase folicular (Fray et al., 2002). No seu conjunto, estas alterações poderão reduzir a fertilidade dos animais afectados de forma mais ou menos duradoura (Grooms, 2004).

O vírus da Diarreia Bovina Viral foi isolado a partir de amostras de oviducto, até 21 dias após infusão intra-uterina com uma estirpe citopática do vírus. Os tecidos observados exibiam também lesões de salpingite. Estas alterações no ambiente do oviducto poderão ter efeitos negativos nas taxas de concepção dos animais afectados (Grooms, 2004).

Apesar de se considerar que o BVDV exerce um efeito directo sobre o embrião, as alterações inflamatórias que se verificam no útero, na sequência da infecção pelo vírus, podem resultar num ambiente uterino incompatível com o desenvolvimento embrionário (Grooms, 2004). O vírus adere à zona pelúcida dos oócitos e embriões, e esta parece protegê-los da infecção, permitindo que o desenvolvimento embrionário normal continue, enquanto a zona pelúcida se manter intacta (Bielanski et al., 2003; Gard et al., 2009; Grooms, 2004). Após a eclosão, ao 8º dia de gestação, os blastocistos apresentam uma viabilidade reduzida quando expostos a estirpes citopáticas do vírus. A infecção por estirpes não-citopáticas não parece influenciar a viabilidade dos embriões. Contudo, é possível que a exposição do embrião a estas estirpes tenha um efeito a longo-prazo sobre o seu desenvolvimento (Grooms, 2004).

É raro que uma fêmea infectada numa fase muito inicial da gestação venha a parir um animal imunotolerante ao vírus (Bielanski et al., 2009). Durante os primeiros 40 dias de gestação não se estabelecem infecções persistentes, possivelmente, devido à produção de elevados níveis de interferão-T pelo trofoblasto. Este interferão, cuja função principal será promover a manutenção da gestação, ao prevenir a luteólise, possui actividade antiviral semelhante à dos restantes interferões tipo I, podendo prevenir a infecção do embrião (Peterhans et al., 2003). A barreira transplacentária não permite que o IFN e anticorpos maternos penetrem na corrente sanguínea fetal, pelo que a resposta imunitária montada pela fêmea gestante, em resposta à infecção pelo BVDV, não previne a infecção do feto (Smirnova et al., 2008).

Após a implantação, a infecção transplacentária do feto pode conduzir a um de cinco desfechos: aborto, desenvolvimento de imunotolerância ao vírus, ocorrência de malformações congénitas, nascimento de animais seropositivos saudáveis, nascimento de animais doentes seropositivos (Grooms, 2004).

O mecanismo de infecção fetal ainda não se encontra perfeitamente esclarecido. Segundo um estudo realizado por Fredriksen, Press, Loken, & Odegaard (1999), com fêmeas PI gestantes, a gestação parece promover a replicação viral. Fredriksen et al. (1999) demonstraram a presença de uma grande concentração de antigénio viral no epitélio do endométrio e das criptas dos placentomas, através da técnica de imunohistoquímica. Apenas algumas células das glândulas endometriais foram positivas para a presença do vírus. A porção fetal dos

placentomas apresentava um baixo nível de infecção, sendo que as maiores concentrações de antígeno viral foram observadas no epitélio coriônico e nos vasos sanguíneos das membranas fetais intercotiledonares, no intestino, no fígado, no baço e nos pulmões do feto. Estes resultados sugerem que o epitélio materno, tanto do endométrio como dos placentomas, poderá ser uma fonte significativa de vírus para o feto (Fredriksen et al., 1999).

Sob condições experimentais, a infecção de fêmeas seronegativas com vírus de qualquer dos biótipos pode causar a morte fetal. A morte fetal associada à infecção pelo BVDV pode sobrevir a qualquer altura, durante a gestação, apesar de ser mais frequente durante o primeiro trimestre. Dependendo do momento da infecção, poderá ocorrer reabsorção fetal, mumificação ou expulsão do feto. A morte fetal sobrevém, geralmente, 10 a 27 dias após a exposição ao vírus, com expulsão do feto cerca de 50 dias mais tarde (Grooms, 2004).

Os fetos que sobrevivem à infecção com o vírus não-citopático, entre os 18 e os 125 dias de gestação, tornam-se, invariável e especificamente, imunotolerantes à variante viral a que foram expostos, convertendo-se em animais persistentemente infectados pelo vírus da Diarreia Bovina Viral (Bolin & Grooms, 2004; Grooms, 2004). Ao contrário do biótipo não-citopático, o vírus citopático não possui a capacidade de estabelecer infecção persistente após exposição durante o período crítico para o desenvolvimento de imunotolerância (Charleston, Fray, Baigent, Carr, & Morrison, 2001; Grooms, 2006; Peterhans et al., 2003).

O mecanismo exacto pelo qual se estabelece a imunotolerância ao vírus permanece por esclarecer, mas assume-se que a circulação do vírus durante o período da gestação em que a imunocompetência se desenvolve (90 a 120 dias de gestação) é um pré-requisito para o estabelecimento de persistência (Grooms, 2004; Smirnova et al., 2008). A estratégia de contornar o sistema imunitário adaptativo através do estabelecimento de tolerância é pouco comum e permite que o vírus seja extremamente bem-sucedido, sem que tenha de empregar as estratégias de evasão habitualmente observadas noutras infecções virais persistentes de animais imunocompetentes (e.g., *antigenic drift*, variação dos antígenos de superfície, e latência viral) (Schweizer, Matzener, Pfaffen, Stalder, & Peterhans, 2006).

A razão pela qual os dois biótipos virais diferem na sua aptidão para gerar infecções persistentes parece assentar na capacidade que apresentam para induzir a síntese de interferão tipo I no feto bovino (Charleston et al., 2001). Charleston et al. (2001) avaliaram a produção de IFN tipo I, em resposta à infecção intra-uterina por estirpes cp e ncp do vírus, através da determinação da actividade biológica do interferão no líquido amniótico e da detecção da expressão de proteína Mx no baço dos fetos em estudo. As proteínas Mx são sintetizadas em resposta aos interferões tipo I e ao dsARN, sendo utilizadas para indicar a bioactividade de IFN tipo I. Os resultados obtidos por Charleston et al. (2001) demonstram que, apesar de replicar a níveis mais elevados que o vírus citopático, o BVDV ncp não desencadeia a síntese de quantidades detectáveis de IFN, enquanto a infecção *in utero* com o BVDV citopático se encontra associada a uma forte resposta de IFN tipo I. Assim, embora o

vírus não-citopático possa estimular fortes respostas de IFN tipo I no decorrer de infecções pós-natais, o mesmo não acontece no decurso das infecções *in utero* (Charleston et al., 2001).

No seu conjunto, os resultados obtidos por Charleston et al. (2001) sugerem que a estimulação da síntese de interferão pelo BVDV cp poderá estar envolvida no controlo das infecções fetais pelo vírus citopático. Uma explicação alternativa é que a indução de IFN previne o desenvolvimento de tolerância imunológica ao vírus, de modo a que a eliminação do vírus ocorra quando o feto se tornar imunocompetente (Charleston et al., 2001).

Curiosamente, é possível que a infecção persistente pelo BVDV ncp não perturbe a sinalização celular via receptor de IFN tipo I, e o subsequente desenvolvimento de um estado antiviral (Peterhans et al., 2003). Na verdade, o tratamento com IFN de células persistentemente infectadas pelo vírus não-citopático protege-as contra a infecção por outros vírus, sem, no entanto, eliminar a infecção pelo BVDV (Schweizer et al., 2006). Isto deve-se ao facto de o sistema imunitário inato apresentar a capacidade de detectar elementos que são comuns a uma ou várias classes de agentes infecciosos, denominados “padrões moleculares associados a patógenos”, ou PAMP, aos quais pertencem, entre outros, fragmentos de ssARN e de dsARN do vírus da Diarreia Bovina Viral (Peterhans & Schweizer, 2009; Tizard, 2004). A activação de receptores de reconhecimento de padrão (PRR) por parte destes PAMP estimula a síntese de interferão, e a ligação deste a receptores para interferão tipo I induz, nas células, um “estado antiviral”. Duas proteínas virais que poderão encontrar-se implicadas na perturbação da indução de IFN são, respectivamente, a N^{pro} e a E^{ms} (Peterhans & Schweizer, 2009). Como foi dito anteriormente, a primeira estimula a degradação do factor de transcrição IRF-3, prevenindo a activação transcricional do gene IFN- β (Chen et al., 2007; Peterhans & Schweizer, 2009). A segunda apresenta actividade ARNase, com uma forte preferência para ssARN, sendo que uma fracção da enzima produzida nas células infectadas é secretada para o compartimento extracelular (Peterhans & Schweizer, 2009). A E^{ms} poderá actuar, degradando o ARN extracelular do *Pestivirus* e prevenindo a sua identificação por receptores PRR, mesmo em células não-infectadas (Matzener, Magkouras, Rumenapf, Peterhans, & Schweizer, 2009; Peterhans & Schweizer, 2009). Esta enzima poderá ser um factor-chave na discriminação *self*-não-*self* do ARN viral, contribuindo para a persistência do BVDV sem, contudo, impossibilitar a resposta imunitária a outros agentes virais (Matzener et al., 2009; Peterhans & Schweizer, 2009).

Assim, a supressão, parcial ou total, da produção de IFN em resposta à infecção pelo vírus não-citopático poderá permitir que as proteínas virais sejam reconhecidas como antígenos *self*, o que resulta na rejeição e destruição de linfócitos B e T anti-BVDV, durante a ontogenia do sistema imunitário adaptativo (Grooms, 2006; Peterhans et al., 2003).

Assim sendo, os animais persistentemente infectados não apresentam quaisquer anticorpos, neutralizantes ou não, contra o vírus persistente (Grooms, 2006). Isto não impede, contudo,

que um animal PI apresente anticorpos anti-BVDV (Collen, Douglas, Paton, Zhang, & Morrison, 2000). Os animais persistentemente infectados por um determinado isolado do vírus são capazes de resolver infecções agudas por um outro isolado antígenicamente heterólogo (Collen et al., 2000). Alguns animais PI possuem, inclusivamente, a capacidade de produzir anticorpos anti-BVDV do mesmo genótipo que o vírus persistente, o que resulta numa imunotolerância específica para determinados epitipos (Brewoo, Haase, Sharp, & Schultz, 2007). Baseados na evidência de que o repertório de linfócitos B de animais PI pode incluir o vírus persistente, enquanto os linfócitos T CD4⁺ *lhes* são completamente tolerantes, Collen et al. (2000) elaboraram a seguinte teoria: durante a indução de tolerância, os linfócitos T específicos para células infectadas pelo BVDV persistente são suprimidos, como se as proteínas virais fossem antígenos *self*. Pelo contrário, a tolerância demonstrada pelas populações de células efectoras (e.g., linfócitos B) pode ser incompleta, pelo que, perante um estímulo por linfócitos T CD4⁺ suficientemente forte ou apropriado, estas poderão ser levadas a responder a uma infecção pelo vírus. Os linfócitos T *helper* específicos para uma determinada proteína de um antígeno complexo, ou para um epitopo dessa mesma proteína, podem promover a activação de linfócitos B específicos para uma proteína diferente do mesmo antígeno. Assim, a infecção por um isolado viral heterólogo pode desencadear uma resposta imunitária devido ao reconhecimento de diferenças entre esse isolado e o vírus persistente. Uma diferença de um único aminoácido entre os isolados poderá ser suficiente para que o sistema imunitário reconheça e desencadeie uma resposta à infecção (Collen et al., 2000). Brewoo et al. (2007) documentaram alguns casos de bovinos PI que desenvolveram anticorpos para os epitopos do BVDV persistente e resolveram a infecção pelo vírus após anos de infecção persistente.

Os animais PI não diferem de forma significativa dos não-PI, no que respeita à distribuição das várias subpopulações de leucócitos, bem como à sua actividade fagocítica (Brewoo et al., 2007).

É de notar que os animais persistentemente infectados são “quimeras”, ou seja, o BVDV nunca infecta, nem todas as células de um único hospedeiro nem, de facto, todas as células do mesmo tipo celular (Peterhans & Schweizer, 2009). O vírus apresenta um marcado epiteliotropismo mas já foi detectado em todos os órgãos, sendo possível que diferentes isolados apresentem diferentes tropismos para cada órgão e tipo celular (Anexo II) (Confer, Fulton, Step, Johnson, & Ridpath, 2005; Liebler-Tenorio, Ridpath, & Neill, 2004; Njaa, Clark, Janzen, Ellis, & Haines, 2000).

A infecção fetal entre os 100 e os 150 dias de gestação, também denominada infecção congénita, resulta frequentemente numa panóplia de malformações fetais. Durante esta fase da gestação, a organogénese encontra-se na sua fase final e o sistema imunitário começa a tornar-se completamente funcional. Estas malformações parecem decorrer da combinação

dos danos celulares directos provocados pelo vírus e daqueles provocados pelas respostas inflamatórias contra o vírus (Grooms, 2004).

Durante o último terço da gestação, quando a organogénese e a imunocompetência já se encontram completas, a infecção transplacentária pelo BVDV gera, frequentemente, uma resposta imunitária eficaz por parte do feto, que culmina na resolução da infecção. Estes animais são, geralmente, normais ao nascimento, possuindo anticorpos neutralizantes anti-BVDV pré-colostrais. No entanto, é possível que os animais que sofreram infecção congénita pelo vírus exibam um maior risco de desenvolver uma doença grave após o nascimento e de virem a apresentar menores índices de fertilidade, quando comparados com animais seronegativos ao nascimento (Grooms, 2004).

Doença das Mucosas

A Doença das Mucosas é uma doença invariavelmente fatal, que sobrevém quando um animal persistentemente infectado com um BVDV não-citopático é super-infectado por um vírus citopático (Carter, 2004; Potgieter, 2004). Como foi dito anteriormente, um vírus citopático é gerado a partir de um vírus não-citopático, devido a fenómenos de recombinação do ARN viral (Bolin & Grooms, 2004; Goens, 2002). Estes dois vírus são antigénicamente idênticos e constituem um “par viral” (Carter, 2004). Quando a mutação ocorre num animal PI com BVDV não-citopático, a população de vírus mutados (citopáticos) expande-se, e ambos os biótipos passam a co-existir no hospedeiro (Goens, 2002). Um animal persistentemente infectado também pode ser super-infectado por um isolado citopático através da transmissão horizontal do vírus (Fritzemeier, Haas, Liebler, Moennig, & Greiser-Wilke, 1997; Loehr, Frey, Moennig, & Greiser-Wilke, 1998; Potgieter, 2004).

A Doença das Mucosas tende a desenvolver-se 2 a 3 semanas após a super-infecção (Doença das Mucosas de Início Precoce), mas, em certos casos, podem decorrer vários meses até que a super-infecção com um vírus citopático culmine nesta doença (Doença das Mucosas de Início Tardio) (Fritzemeier et al., 1997). Fritzemeier et al. (1997) propuseram dois mecanismos fisiopatológicos distintos para explicar esta variação no período de incubação da doença. Segundo Fritzemeier et al. (1997), a infecção por um vírus citopático antigenicamente semelhante ao vírus ncp persistente desencadeia a Doença das Mucosas após poucas semanas, enquanto que a infecção por um vírus citopático antigenicamente distinto do vírus ncp persistente levará meses a desencadear a doença. Um vírus cp antigenicamente semelhante ao vírus persistente (e.g., um vírus cp resultante da recombinação do ARN do vírus ncp persistente) é reconhecido pelo sistema imunitário como *self* e não desencadeia uma resposta imune (Fritzemeier et al., 1997; Potgieter, 2004). Isto permite que o vírus cp se dissemine rapidamente pelo organismo, fazendo com o que o animal sucumba à Doença das Mucosas em 2 a 3 semanas, sem que tenha produzido anticorpos neutralizantes contra o vírus super-infectante (Fritzemeier et al., 1997; Potgieter, 2004). Pelo contrário, um vírus cp

antigenicamente distinto do vírus persistente (e.g., um vírus cp proveniente de uma infecção horizontal) é reconhecido como não-*self*, dando origem a uma resposta imune, com produção de elevados títulos de anticorpos neutralizantes (Fritzemeier et al., 1997; Potgieter, 2004). O organismo é, assim, capaz de resolver a infecção pelo vírus super-infectante, mas não antes deste se recombinar com o vírus ncp persistente (Fritzemeier et al., 1997). Desta recombinação resultam novas populações de vírus híbridos, que o sistema imunitário vai eliminando, até que se produza um vírus híbrido que, apesar de citopático, possui as sequências genéticas que codificam os antigénios do vírus ncp que o organismo reconhece como *self* (Fritzemeier et al., 1997; Potgieter, 2004). Esta característica do novo vírus impede que o organismo resolva a nova infecção. Eventualmente, meses depois da super-infecção original, o animal sucumbe à Doença das Mucosas (Fritzemeier et al., 1997).

A Doença das Mucosas pode ser aguda ou crónica, sendo que a última se pode prolongar durante 18 meses. Os factores que influenciam o curso da doença não são conhecidos e não se encontra estabelecida uma relação entre o período de incubação da doença e a duração dos sinais clínicos (Potgieter, 2004).

Lesões

Infecção primária pós-natal

As infecções agudas pós-natais pelo vírus da Diarreia Bovina Viral podem ser subclínicas, ligeiras ou graves. As lesões histopatológicas básicas são semelhantes, variando no grau em que se manifestam no animal. O desenvolvimento e severidade das lesões induzidas pelo vírus dependem fortemente do isolado viral envolvido (Potgieter, 2004).

As lesões macroscópicas observadas correspondem às de uma enterite acompanhada de edema da mucosa e submucosa, e de hemorragias petequiais e equimóticas, especialmente nas porções distais do íleo e no cólon proximal. É comum desenvolver-se linfadenite mesentérica e formação de petéquias no mesentério. Presentes entre as restantes lesões macroscópicas encontram-se, invariavelmente, erosões orais e/ou esofágicas, únicas ou múltiplas. Os hemonodos poderão apresentar-se hipertrofiados (Potgieter, 2004).

Os vírus do genótipo 2 causam hemorragias petequiais e equimóticas, que podem ocorrer na esclera e conjuntiva, no endocárdio e epicárdio, nas superfícies serosas e membranas mucosas de todo o tracto digestivo, no baço, na maioria dos linfonodos, na cavidade oral, nos músculos esqueléticos, na vesícula biliar, na bexiga e nos testículos (Potgieter, 2004).

As lesões microscópicas encontram-se, geralmente, confinadas aos sistemas alimentar e linfóide, e ao aparelho respiratório. Em conjunto com as lesões inflamatórias, o edema da mucosa e da submucosa do tracto gastrointestinal manifesta-se pela dilatação dos vasos linfáticos da submucosa e pela separação das fibras musculares lisas da subcamada interna da camada muscular. É comum observar-se lise dos linfócitos dos folículos linfóides da submucosa intestinal e dos linfonodos mesentéricos (Potgieter, 2004). Os restantes linfonodos, as placas de Peyer e o baço podem apresentar depleção linfóide (Liebler-Tenorio et al., 2004). Adicionalmente, observa-se lesões de traqueíte, caracterizadas por necrose coagulativa das células epiteliais da mucosa, sendo possível encontrarem-se infiltrados neutrofílicos na mucosa e submucosa (Potgieter, 2004).

Pedreira et al. (2009) descreveram as seguintes lesões no íleo de bezerros privados de colostro, sujeitos a infecção experimental por um isolado de BVDV-1 não-citopático: ulceração focal da mucosa, infiltração mononuclear da *lamina propria*, hiperémia e hemorragias na *lamina propria* e nas áreas interfoliculares, hemorragias nos folículos linfóides da submucosa, depleção linfóide e infiltração por macrófagos nos folículos da submucosa e nas áreas interfoliculares.

A infecção com alguns isolados do BVDV-2 pode dar origem a broncopneumonia multifocal, atrofia da medula óssea vermelha, e necrose e erosões das membranas mucosas do tracto gastrointestinal (Potgieter, 2004). Também foram descritas lesões de vasculite severa nas arteríolas e pequenas artérias da região do hilo dos linfonodos retrofaríngeo, mandibular e parotídeo. Estas lesões caracterizam-se por áreas multifocais de necrose fibrinóide e por

infiltrados linfocíticos perivasculares, tendo sido descritas lesões semelhantes no miocárdio (Liebler-Tenorio et al., 2004).

Como já foi referido acerca dos efeitos do BVDV sobre o aparelho reprodutor, a infecção aguda origina, nos machos, orquites crónicas e diversos graus de necrose das células da granulosa, nas fêmeas (Givens, Riddell, Edmondson et al., 2009; McGowan et al., 2003). Também foram descritas lesões de ooforite linfocítica intersticial crónica e lesões de salpingite no útero de fêmeas com infecções agudas pelo vírus da Diarreia Bovina Viral (Grooms, 2004; Grooms et al., 1998).

Infecção pré-natal (*in utero*)

Como foi dito anteriormente, as consequências da infecção *in utero* pelo BVDV são várias e dependem da conjugação de vários factores (Grooms, 2004). A infecção vertical durante o primeiro trimestre da gestação pode levar a morte embrionária/fetal e consequente reabsorção, mumificação ou aborto (Grooms, 2004; Potgieter, 2004). Devido ao intervalo entre a morte fetal e o diagnóstico subsequente de aborto, as lesões fetais e placentárias observadas não são características, e raramente são evidentes devido à autólise (Grooms, 2004; Potgieter, 2004). Quando podem ser visualizadas, consistem em reacções inflamatórias necrosantes, que envolvem uma grande variedade de tecidos (Potgieter, 2004).

Alguns animais com infecções persistentes pelo BVDV podem apresentar malformações compatíveis com a vida (e.g., atrasos de crescimento), como consequência da infecção *in utero*. A análise necrópsica/histopatológica de animais PI pode revelar nefrite intersticial focal, com infiltração mononuclear e focos de espessamento das membranas basais dos glomérulos. Pode ainda ocorrer encefalite marcada por infiltrados de células mononucleares, hepatite caracterizada por ligeiros infiltrados de células mononucleares nos espaços-porta, focos de hiperplasia linfóide peribronquiolar, e necrose focal com infiltração por células mononucleares do epitélio da língua e esófago (Potgieter, 2004).

No entanto, muitos são os animais PI que não apresentam quaisquer lesões macroscópicas (Liebler-Tenorio et al., 2004; Montgomery, 2007; Potgieter, 2004).

Borel et al. (2007) descreveram o caso de um touro persistentemente infectado, com hipoplasia testicular bilateral grave. Nas vacas PI, os ovários encontram-se, frequentemente, hipoplásicos e o número de folículos antrais é significativamente reduzido, quando em comparação com vacas saudáveis (Grooms, 2004).

Os fetos infectados entre os 100 e os 150 dias de gestação desenvolvem, frequentemente, uma panóplia de malformações congénitas, entre as quais se encontram: artrogrifose, microencefalia, hidrocefalia, hidranencefalia, porencefalia, hipoplasia cerebelosa, hipomielinização da medula espinhal, cataratas, microftalmia, nevrite óptica, degenerescência da retina, hipoplasia do timo, hipotricose/alopécia, pêlo encaracolado, *hyena disease*,

alterações da osteogénese, braquignatismo mandibular, hipoplasia pulmonar e atrasos do crescimento (Carter, 2004; Grooms, 2004; R.L. Larson et al., 2004).

A análise histológica de cada uma das lesões indica que são resultantes de paragens no desenvolvimento, alterações degenerativas e/ou processos inflamatórios. A hipoplasia cerebelosa inicia-se com vasculite e edema, e resulta da redução da espessura das camadas molecular e granulosa, e da redução e deslocamento das células de Purkinje. A desmielinização e a infiltração por células mononucleares podem ser proeminentes. A coriorretinopatia observada é geralmente devida a despigmentação e a perda de neurónios, de cones e de bastonetes. Pode encontrar-se presente uma catarata capsular no cristalino, associada à degenerescência das fibras. Não são incomuns a infiltração da córnea por células mononucleares e a gliose do nervo óptico. Pode ainda observar-se persistência da membrana pupilar (Potgieter, 2004).

Doença das Mucosas

A Doença das Mucosas caracteriza-se por lesões necróticas de gravidade variável, localizadas primariamente no tracto gastrointestinal, órgãos linfóides e pele. As alterações patológicas básicas observadas nas formas aguda e crónica da doença são geralmente semelhantes (Potgieter, 2004). As lesões macroscópicas da forma aguda incluem erosões/úlceras nas membranas mucosas ou epitélio do focinho, lábios, cavidade oral, língua, narinas, cavidade nasal, esófago, pilares do rúmen, retículo e abomaso (McGavin & Zachary, 2007; Potgieter, 2004; Radostits et al., 2007). As erosões da mucosa nasal e narinas são geralmente pequenas (Potgieter, 2004). As esofágicas tendem a apresentar forma alongada, podendo estar recobertas por membranas diftéricas (McGavin & Zachary, 2007; Potgieter, 2004). No abomaso, as erosões/úlceras podem encontrar-se associadas a hemorragia e edema. As lesões intestinais variam na sua natureza e extensão, podendo apresentar-se sob a forma de enterite catarral, hemorrágica, fibrino-necrótica e/ou erosiva/ulcerativa. As placas de Peyer encontram-se necróticas e hemorrágicas, e a mucosa que as recobre manifesta, invariavelmente, uma reacção inflamatória grave. Outras alterações do tecido linfóide incluem atrofia do timo, e edema e hipertrofia dos linfonodos periféricos (Potgieter, 2004).

Na forma crónica da Doença das Mucosas, as lesões macroscópicas do tracto gastrointestinal superior são frequentemente insignificantes ou inexistentes. A presença de lesões cutâneas é, contudo, uma característica frequente da forma crónica (Potgieter, 2004). Estas apresentam-se como erosões e/ou eczema ou hiperqueratose, e são mais evidentes no períneo, pescoço, espádua, abertura prepucial, escroto, vulva, úngulas, espaços interdigitais e bandas coronárias (Potgieter, 2004; Radostits et al., 2007). Pode ocorrer infecção secundária destas lesões. As lesões eczematosas caracterizam-se por hiperqueratose, hipotricose e/ou alopecia. Pode ainda desenvolver-se laminite, necrose interdigital e deformação das úngulas (Potgieter, 2004).

São comuns as lesões de conjuntivite. Em certos casos, observa-se ainda broncopneumonia e pleurisia fibrinosa, devidas a infecção bacteriana secundária (Potgieter, 2004).

As lesões histopatológicas associadas à Doença das Mucosas incluem infiltração por células mononucleares e necrose dos epitélios queratinizados, do epitélio das criptas das vilosidades intestinais e dos tecidos linfóides. Nos epitélios queratinizados, observa-se, inicialmente, uma infiltração da derme e/ou *lamina propria* por células mononucleares. Posteriormente, verifica-se hemorragia e necrose celular generalizada, que culmina na formação de focos necróticos no estrato espinhoso, cobertos por um estrato córneo intacto. Quando a integridade deste estrato se perde, desenvolvem-se as lesões erosivas características da Doença das Mucosas. A hiperqueratose e paraqueratose podem ser proeminentes em certas lesões (Potgieter, 2004).

No intestino, a degenerescência e necrose das células epiteliais das criptas resulta na acumulação de detritos celulares e de muco no lúmen distendido das criptas. Eventualmente, observa-se atrofia das vilosidades, que se encontram cobertas por células epiteliais achatadas. A *lamina propria* apresenta-se fibrótica e praticamente acelular. Em algumas áreas, a metaplasia escamosa das células epiteliais, acompanhada de grave infiltração da *lamina propria* por macrófagos e outras células mononucleares, pode ser a lesão primária das criptas. É possível observar hemorragia, edema e diapedese na *lamina propria*. Na forma aguda da doença, observa-se, ainda, uma grave depleção celular e distorção da arquitectura das placas de Peyer. Na forma crónica, as placas de Peyer encontram-se atrofiadas, sendo apenas possível observar tecido fibrótico, contendo pequenos focos de tecido linfóide (Potgieter, 2004).

As alterações histopatológicas encontradas no timo, nos animais com Doença das Mucosas aguda, incluem a depleção dos tímocitos corticais e medulares, sem que, no entanto, se perca a arquitectura original do órgão. É possível observar a presença de numerosas e grandes células epiteliais e de macrófagos activados no córtex. Na forma crónica, verifica-se destruição progressiva da estrutura e organização do timo, associada a atrofia grave do córtex (Potgieter, 2004).

As alterações dos linfonodos variam e incluem a depleção dos linfócitos foliculares e das zonas subjacentes aos seios subcapsulares. A medular pode encontrar-se relativamente normal ou ligeiramente hipertrofiada, em parte devido a acumulação de células mononucleares. No baço, verifica-se depleção linfóide das bainhas linfóides periarteriolares, sendo as alterações foliculares semelhantes às observadas nos linfonodos. As alterações observadas nas tonsilas assemelham-se às dos linfonodos e placas de Peyer (Potgieter, 2004).

Com o objectivo de comparar as lesões encontradas à necrópsia de animais que desenvolveram Doença das Mucosas de Início Precoce com aquelas apresentadas por animais com Doença das Mucosas de Início Tardio, Liebler-Tenorio, Lanwehr, Greiser-Wilke,

Loehr, & Pohlenz (2000) induziram experimentalmente estas duas variantes da Doença das Mucosas em animais PI. Em ambos os casos, Liebler-Tenorio et al. (2000) observaram lesões erosivas de extensão e gravidade diversas, na cavidade oral, esófago e rúmen. As lesões caracterizavam-se pela perda de células epiteliais dos estratos basal e espinhoso, e pela infiltração do epitélio e da *lamina propria* por macrófagos e linfócitos (Liebler-Tenorio et al., 2000). Liebler-Tenorio et al. (2000) observaram, ainda, lesões de erosão/ulceração no abomaso.

No tracto digestivo inferior, os animais com Doença das Mucosas de Início Precoce apresentavam lesões frequentemente limitadas à mucosa sobre as placas de Peyer, sem alteração da mucosa adjacente. As zonas correspondentes a estas placas apresentavam depressões, ou chanfraduras (devido, entre outros, à severa depleção dos folículos linfóides), frequentemente cobertas por fibrina e coágulos de sangue. O tecido linfóide da transição ileocecal e do cólon proximal apresentava aspecto nodular, sendo possível observar lesões erosivas e ulcerativas não-associadas ao MALT, do jejuno e cólon. Nos animais que desenvolveram Doença das Mucosas de Início Tardio, as lesões não-associadas ao GALT eram mais comuns (Liebler-Tenorio et al., 2000). Adicionalmente, Liebler-Tenorio et al. (2000) descreveram lesões de jejunitis, ileíte e colite ulcerativa. Em certos casos, as placas de Peyer apresentavam-se gravemente depletadas, sendo que noutros se encontravam inalteradas, mas aparentemente inactivas. As lesões microscópicas observadas caracterizavam-se por focos de destruição do epitélio de parte das criptas e por focos de hiperplasia reactiva de outras, culminando na distorção e eventual atrofia grave da mucosa. Nos casos de Doença das Mucosas de Início Precoce, as placas de Peyer apresentavam uma severa depleção celular, sendo frequente observarem-se folículos linfóides vestigiais, formados por células dendríticas foliculares e macrófagos. Nos casos de Doença das Mucosas de Início Tardio, verificava-se a ausência total de tecido linfóide ou a sua redução a um infiltrado celular linear da submucosa. Nestes casos, também se encontravam presentes alterações dos vasos sanguíneos da submucosa intestinal, consistentemente observadas abaixo de placas de Peyer alteradas e de complexos linfoglandulares do cólon. Não se observaram lesões comparáveis nos casos de Doença das Mucosas de Início Precoce. As arteríolas e pequenas artérias encontravam-se predominantemente afectadas por uma perda segmentar da sua arquitectura e pela deposição de material PAS-positivo nas camadas íntima e média. Linfócitos e macrófagos rodeavam os vasos alterados (Liebler-Tenorio et al., 2000).

Os restantes tecidos linfóides exibiam depleção moderada a grave, sendo que o córtex do timo se encontrava severamente atrofiado. Alguns animais apresentavam lesões de broncopneumonia catarral a purulenta. Outras lesões observadas incluíam erosões no espaço interdigital e nefrite intersticial não-supurada multifocal ligeira. Observaram-se, ainda, lesões de necrose hepática focal (Liebler-Tenorio et al., 2000).

Sinais Clínicos

Infecção primária pós-natal

Setenta a 90% dos animais imunocompetentes infectados pelo vírus da Diarreia Bovina Viral não desenvolvem sinais clínicos óbvios de doença (Potgieter, 2004). Um exame clínico pormenorizado destes animais pode revelar leucopénia, pirécia ligeira e, em algumas vacas, queda da produção leiteira (Potgieter, 2004; Radostits et al., 2007). Alguns animais podem ainda apresentar inapetência e diarreia (Radostits et al., 2007). Os animais com quadros ligeiros ou subclínicos da doença podem apresentar-se virémicos durante 4 a 15 dias pós-infecção, recuperando rapidamente e exibindo anticorpos séricos após duas a quatro semanas (Potgieter, 2004; Radostits et al., 2007).

O termo Diarreia Bovina Viral aplica-se aos casos de infecção primária em que os animais exibem sinais clínicos evidentes. A doença traduz-se em surtos de diarreia aquosa de gravidade variável, que normalmente envolvem animais de manadas susceptíveis, entre os 6 e os 12 meses de idade. A morbilidade flutua entre os 30 e os 90%, enquanto a mortalidade é, geralmente, inferior a 8%. Os sinais clínicos tendem a durar até 7 dias, podendo incluir pirécia transitória, leucopénia, depressão, anorexia, taquipneia, corrimento ocular e nasal, hipersialia, erosões e úlceras orais, diarreia e, em vacas, queda da produção leiteira (Potgieter, 2004).

O BVDV-2 encontra-se associado a uma variedade mais severa da forma entérica da doença, com taxas de morbilidade até 40% e mortalidade entre os 10 e os 25% (Potgieter, 2004; Radostits et al., 2007). Os sinais clínicos caracterizam-se por um início súbito, podendo incluir: prostração severa, stress respiratório, anorexia, leucopénia, trombocitopénia, diarreia aquosa profusa, disenteria, conjuntivite, corrimento nasal, hipersialia, úlceras orais, febre até 42°C, queda da produção leiteira ou agaláxia, e aborto tardio (Potgieter, 2004; Radostits et al., 2007). Muitos animais podem morrer pouco tempo após o início dos sinais clínicos, sendo possível observar-se um aumento no número de nascimentos de animais persistentemente infectados, na época de partos seguinte (Radostits et al., 2007). Certos surtos, comumente associados à infecção pelo BVDV-2, podem traduzir-se em síndromes respiratórias e/ou hemorrágicas (Carter, 2004; Potgieter, 2004). Os animais que desenvolvem estas síndromes hemorrágicas apresentam diarreia sanguinolenta, hemorragias equimóticas e petequiais nas mucosas visíveis, hifema, *epistaxis*, hemorragias em locais de injeção e de picadas de insectos. O número de plaquetas pode ser inferior a 25000/ μ l. Também são comuns a febre, estase ruminal e desidratação. A mortalidade ronda os 25%. A recuperação dos animais sobreviventes pode, ou não, ser total (Radostits et al., 2007).

A infecção pelo BVDV encontra-se frequentemente associada a doenças do tracto respiratório, quer devido aos efeitos directos causados pelo vírus, quer devido a infecção

bacteriana secundária (Baule et al., 2001; O'Connor, Martin, Nagy, Menzies, & Harland, 2001; Potgieter, 2004; Welsh et al., 1995).

Infecção pré-natal (*in utero*)

A infecção embrionária/fetal pelo vírus da Diarreia Bovina Viral tende a reflectir-se nos parâmetros reprodutivos das fêmeas (Carter, 2004; Grooms, 2004; Radostits et al., 2007). As taxas de aborto geralmente variam entre os 2 e os 7%, podendo atingir os 27% (Potgieter, 2004). Alguns animais persistentemente infectados podem não exibir quaisquer sintomas de doença (Carter, 2004). Outros podem nascer mais pequenos que os seus contemporâneos e apresentar atrasos de crescimento (Radostits et al., 2007). Podem, também, exibir sinais de doença respiratória, intestinal ou articular, associadas a infecções bacterianas secundárias à imunossupressão (Carter, 2004; R.L. Larson et al., 2004). Adicionalmente, estes animais podem apresentar alterações da pele e da pelagem (i.e., pêlo encaracolado), alterações neurológicas e alterações hematológicas (Bachofen et al., 2009; Radostits et al., 2007). Num estudo com 68 animais PI, Bachofen et al. (2009) observaram os seguintes sinais clínicos: redução da ingestão de alimento e hipoperistaltismo ruminal em cerca de 90% dos animais; perda de condição corporal, hipomotilidade intestinal, diarreia, desidratação e ruídos respiratórios em mais de 60% dos animais; taquicardia e erosões na cavidade oral em cerca de 50% dos animais; e febre e corrimento nasal em menos de 40% dos animais em estudo. Se sobreviverem até à idade adulta, os machos PI podem ser férteis (Marley et al., 2009). As fêmeas PI podem ficar gestantes, dando origem a descendência PI (Lindberg & Houe, 2005). Contudo, a maioria destes animais sucumbe à Doença das Mucosas entre os 6 e os 24 meses de vida (Carter, 2004).

Os animais que nascem com malformações congénitas devidas a infecção pelo vírus entre os 100 e os 150 dias de gestação apresentam sintomas relacionados com as mesmas (Potgieter, 2004; Radostits et al., 2007). Os animais com hipoplasia cerebelosa e outras anomalias cerebrais podem ter dificuldades em levantar-se, acompanhadas de ataxia (Potgieter, 2004; Radostits et al., 2007). Estes animais podem ainda apresentar tremores, possivelmente como consequência de hipomielinogénese. Não é incomum que estes animais apresentem cataratas, cegueira e opacidade da córnea (Potgieter, 2004).

Doença das Mucosas

Como foi referido anteriormente, a maioria dos animais persistentemente infectados sucumbe à Doença das Mucosas entre os 6 e os 24 meses de vida (Carter, 2004). Numa manada infectada, um grupo de 5 a 25% dos animais desta faixa etária pode desenvolver a doença mais ou menos simultaneamente, num surto que pode durar vários dias. Alternativamente, a doença pode manifestar-se pela ocorrência de casos esporádicos, que se vão verificando durante várias semanas ou meses (Radostits et al., 2007). A morbilidade tende a ser baixa

(<5%) mas encontram-se descritos surtos com morbilidades de 44%, em manadas isoladas (Potgieter, 2004; Radostits et al., 2007). A taxa de mortalidade é de cerca de 100%, tendo sido relatados casos de animais PI que desenvolvem apenas sinais transitórios da doença. Isto sugere que a recuperação, apesar de rara, é possível (Potgieter, 2004). Podem ser afectados animais bem-nutridos e clinicamente normais, sendo possível que, durante um surto grave, apenas uma parte do número real de PI da manada venha a morrer de Doença das Mucosas. Os restantes animais PI poderão ter sido refugados ou abatidos para consumo, ou ainda ter morrido devido a outras causas (Radostits et al., 2007).

Não é possível distinguir entre os animais que desenvolvem Doença das Mucosas de Início Precoce e Doença das Mucosas de Início Tardio com base no quadro clínico que apresentam (Liebler-Tenorio et al., 2000). A forma aguda da Doença das Mucosas caracteriza-se por prostração, anorexia, hipersialia, pirécia (40 a 41°C), taquicardia, taquipneia, corrimento ocular e nasal mucopurulento, acidose, atonia ruminal, diarreia aquosa profusa, tenesmo e emaciação (Bruschke et al., 1998; Potgieter, 2004; Radostits et al., 2007). São frequentemente identificadas erosões, úlceras e extensas áreas de necrose das mucosas dos lábios e comissuras labiais, gengivas, almofada dentária, língua e palato mole (Potgieter, 2004; Radostits et al., 2007). É possível observar lesões semelhantes no focinho, cavidade nasal, vulva e tetos (Potgieter, 2004; Radostits et al., 2007). Os animais afectados apresentam, frequentemente, trombocitopenia, podendo ainda apresentar leucopenia grave. Esta expressa-se por neutropenia e linfopenia, que podem estar presentes nas fases iniciais da doença (Potgieter, 2004). As fezes dos animais afectados apresentam cheiro particularmente desagradável e podem conter quantidades variáveis de sangue, muco e material necrótico (Potgieter, 2004; Radostits et al., 2007). Ocasionalmente, observa-se pequenas porções de moldes intestinais de fibrina, nas fezes (Radostits et al., 2007). A diarreia inicia-se, geralmente, dois a quatro dias após o início dos sinais clínicos, mas, nos casos hiperagudos, o animal pode morrer antes que esta se torne evidente (Potgieter, 2004; Radostits et al., 2007). A forma aguda da Doença das Mucosas pode durar entre 2 e 21 dias, desde o início dos sintomas até à morte do animal (Potgieter, 2004).

A forma crónica da Doença das Mucosas tem uma evolução mais prolongada no tempo (até 18 meses) (Potgieter, 2004; Radostits et al., 2007). Os sinais clínicos são semelhantes aos da forma aguda, mas menos severos (Potgieter, 2004). A doença caracteriza-se por anorexia, emaciação progressiva, diarreia contínua ou intermitente, e corrimento nasal e ocular (Potgieter, 2004; Radostits et al., 2007). Os animais tendem a apresentar anemia, neutropenia e linfopenia, sendo comuns as infecções secundárias (Potgieter, 2004). Estes animais podem, ainda, sofrer de timpanismo crónico e apresentar lesões cutâneas, que incluem áreas de alopecia e hiperqueratose/eczema na região cervical, e erosões cobertas por crostas na cavidade oral, região perineal, vulva, orifício prepucial, bandas coronárias, espaços interdigitais, e úngulas (Potgieter, 2004; Radostits et al., 2007). O facto de estas lesões não

sararem é sugestivo da forma crónica de Doença das Mucosas (Radostits et al., 2007). As lesões nos membros podem levar os animais a claudicar (Potgieter, 2004). Os animais afectados sucumbem, eventualmente, devido a debilidade e inanição crónicas (Potgieter, 2004; Radostits et al., 2007).

Efeitos do BVDV nas explorações de bovinos de engorda

Dados epidemiológicos sugerem que o vírus da Diarreia Bovina Viral poderá ser um dos agentes infecciosos de maior importância económica na produção de bovinos de engorda, afectando todas as fases do ciclo de produção (Kelling, 2004; Radostits et al., 2007).

Os animais persistentemente infectados tendem a apresentar taxas de crescimento mais baixas que o normal e, frequentemente, morrem após desenvolverem a Doença das Mucosas, ou outras doenças, durante o período de engorda (Campbell, 2004; Kelling, 2004).

Embora a maior parte das infecções agudas pelo BVDV tenha um carácter subclínico, estas encontram-se associadas a casos esporádicos de morte em bovinos de engorda (Campbell, 2004).

A perda de alguns animais persistentemente infectados, devido à Doença das Mucosas, talvez não seja significativa no panorama económico da produção de bovinos de carne (Campbell, 2004). Contudo, as infecções agudas, ou transitórias, muitas vezes geradas devido ao contacto de animais saudáveis com animais PI, desempenham um importante papel como agentes imunodepressores, ou como potenciadores de outras doenças (e.g., salmonelose, rotavirose, coronavirose, estomatite papular bovina e infecções por *E. coli*). Os efeitos sinérgicos do BVDV com outros agentes patogénicos encontram-se demonstrados em vários estudos (Grooms, 2008). Nos bovinos de engorda, a potenciação de doenças respiratórias pelo BVDV, através da sua acção sinérgica com agentes como o vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, *Mannheimia haemolytica* ou *Mycoplasma bovis*, adquire especial importância, uma vez que os animais que são infectados pelo vírus, e que sofrem seroconversão durante o período de engorda, apresentam maior probabilidade de virem a receber tratamento para doenças respiratórias (Campbell, 2004; Carman et al., 1998; Shahriar, Clark, Janzen, West, & Wobeser, 2002). Apesar de existirem evidências de que algumas estirpes do vírus são capazes de gerar doença respiratória primária, o papel do BVDV como patogénio respiratório primário permanece controverso (Baule et al., 2001; Campbell, 2004).

Actualmente, as perdas reprodutivas serão, talvez, a mais importante consequência das infecções pelo BVDV. Estas podem manifestar-se das mais diversas formas, variando entre uma redução insidiosa da *performance* reprodutiva da manada e devastadores surtos de aborto. A infecção de fêmeas susceptíveis pelo vírus da Diarreia Bovina Viral encontra-se associada a baixas taxas de concepção, morte embrionária precoce, aborto, defeitos congénitos e ao nascimento de vitelos débeis (Grooms, 2006).

Diagnóstico

O diagnóstico de infecções por BVDV baseia-se, para além da anamnese e do exame clínico, numa série de exames complementares de diagnóstico disponíveis (Radostits et al., 2007). Cada um destes exames pode ser inserido numa de quatro categorias ou métodos de diagnóstico: isolamento do vírus, detecção de antígeno viral, detecção de ARN viral, detecção de anticorpos. Como em qualquer verdadeiro acto de diagnóstico, o clínico nunca deve depender de um único teste para obter a resposta correcta em todos os casos. A utilização de múltiplos testes em várias amostras é sempre a melhor abordagem (Saliki & Dubovi, 2004).

Isolamento do vírus (IV)

Apesar de todos os avanços na área do diagnóstico da Diarreia Bovina Viral, a cultura e identificação do vírus a partir de amostras de animais suspeitos permanece o *gold standard*, entre os métodos de diagnóstico disponíveis (R. L. Larson et al., 2005; Potgieter, 2004; Radostits et al., 2007; Saliki & Dubovi, 2004).

No animal vivo, a melhor amostra para isolamento do BVDV é o sangue inteiro, do qual os glóbulos brancos (*buffy coat*) são extraídos e utilizados como inóculo (Saliki & Dubovi, 2004). As melhores amostras de necrópsia ou de produtos de aborto são as de tecidos linfóides, como o baço, placas de Peyer, linfonodos mesentéricos e timo (Potgieter, 2004; Saliki & Dubovi, 2004). Devido ao período de tempo que medeia entre a infecção/morte fetal e o aborto, o isolamento do vírus a partir de material abortado nem sempre é possível (Grooms, 2004). Outras amostras frequentemente enviadas, como zaragatoas nasais, sémen, fezes, e vários tecidos, podem não ser óptimas para o isolamento viral em infecções agudas, devido a uma possível interferência de anticorpos neutralizantes. Nos animais persistentemente infectados, a quantidade de vírus presente no organismo é tão elevada que é virtualmente possível isolar o BVDV a partir de qualquer secreção, excreção ou amostra de tecido. A estabilidade do vírus nas amostras é boa, permitindo que sejam enviadas para o laboratório, acondicionadas em gelo, sujeitas a 1 a 2 dias em refrigeração, sem comprometer a viabilidade do teste (Saliki & Dubovi, 2004). Amostras que tenham permanecido até cinco dias à temperatura ambiente, num ambiente húmido, permitem igualmente o isolamento do vírus (Potgieter, 2004; Radostits et al., 2007).

As estirpes citopáticas causam alterações celulares características, que são visíveis após cerca de 48 horas de incubação (Radostits et al., 2007). 70 a 90% dos isolados de BVDV pertencem ao biótipo não-citopático, obrigando a um segundo teste (geralmente imunofluorescência), para detecção do vírus (Carter, 2004; Saliki & Dubovi, 2004).

Para testagem de um grande número de animais (e.g., pesquisa de animais PI numa manada), as culturas de células são inoculadas com soro dos animais a testar, em placas de 96 pocilhos, e testadas ao fim de 4 dias de incubação, com recurso às técnicas de ELISA ou

da imunoperoxidase. Apesar de muito preciso e fiável na detecção de PI, este método não é sensível no diagnóstico de infecções agudas. A maior limitação desta técnica na detecção de PI é o facto de não poder ser aplicada em animais com menos de 3 meses (Saliki & Dubovi, 2004). Os anticorpos maternos levam à diminuição da virémia, interferindo com o isolamento do vírus e dando origem a falsos negativos (Brock, Grooms, Ridpath, & Bolin, 1998). A produção de anticorpos neutralizantes por estes animais, após contacto com isolados antigénicamente heterólogos, pode igualmente causar oscilações da virémia e interferir com a técnica (Brock et al., 1998; Collen et al., 2000).

Outras desvantagens do isolamento viral prendem-se com os seus custos e com a necessidade de re-testagem dos positivos após 3 a 4 semanas, para distinção entre animais PI e TI (R. L. Larson et al., 2005).

Detecção de antigénio viral

A detecção directa de antigénio viral em amostras suspeitas é bastante mais rápida e económica que o isolamento do vírus. Actualmente, encontram-se disponíveis dois tipos de técnicas: técnicas de ELISA para captura de antigénio (AgELISA) e técnicas de imuno-coloração de tecidos frescos ou fixados em formol (Saliki & Dubovi, 2004).

ELISA para captura de antigénio (AgELISA)

Os testes de AgELISA são particularmente úteis na detecção de animais PI, sendo pouco fiáveis no diagnóstico de infecções agudas (Saliki & Dubovi, 2004). A maioria destes testes requer a existência de células na amostra para produzir resultados fiáveis, tendo sido desenvolvidos vários *kits* que utilizam amostras de leucócitos e de vários tecidos (e.g., pele) para detecção do BVDV (Radostits et al., 2007; Saliki & Dubovi, 2004). A necessidade de extrair os leucócitos das amostras de sangue, e de processar as amostras de tecido, previamente à aplicação do teste, constitui uma limitação relativa na sua aplicação a um elevado número de animais (Saliki & Dubovi, 2004). Também se encontram disponíveis *kits* de AgELISA que detectam o vírus em amostras de soro, e que podem ser igualmente utilizados em amostras de pele da orelha (tecido fresco ou congelado) (Radostits et al., 2007; Saliki & Dubovi, 2004). A sensibilidade destes testes é semelhante, sendo superior a 93% para ambos (Cornish et al., 2005; Hilbe et al., 2007). A especificidade de cada um destes testes é de 98-100% e de aproximadamente 99%, respectivamente (Cornish et al., 2005; Hilbe et al., 2007). Uma desvantagem da utilização de amostras de soro, em relação à utilização de amostras de pele, é o facto de a primeira necessitar que os animais positivos sejam re-testados após 3 semanas, para distinção entre animais PI e TI, enquanto a segunda geralmente só detecta animais PI (R. L. Larson et al., 2005). Adicionalmente, enquanto a AgELISA em amostras de soro pode ser prejudicada pela presença de anticorpos maternos, a AgELISA em amostras de pele não sofre qualquer interferência destes anticorpos, podendo

ser utilizada para testar animais de qualquer idade (Cornish et al., 2005; R. L. Larson et al., 2005). Ambas as técnicas apresentam um custo relativamente baixo (R. L. Larson et al., 2005).

Com o objectivo de reduzir os custos da testagem de grandes números de animais, Cleveland, Salman, & Van Campen (2006) aplicaram testes de AgELISA a *pools* de 2 a 5 amostras de soro e de pele. Os valores sensibilidade obtidos variavam com o tamanho do *pool*, sendo de 72,17% (n=5 amostras) a 98,58% (n=2 amostras) para amostras de pele, e de 1,42% (n=5 amostras) a 14,29% (n=2 amostras) para amostras de soro. Os valores de especificidade variaram entre 94,34% (n=2 amostras) e 100% (n=5 amostras) para amostras de pele, sendo de 100% para as amostras de soro. A explicação para estes resultados parece residir na interferência produzida pelos anticorpos neutralizantes anti-E^{ms} (proteína estrutural em cuja detecção se baseia o teste), presentes no soro dos animais previamente vacinados ou infectados pelo vírus. Estes anticorpos poderão reagir com as partículas virais circulantes, ligando-se aos respectivos antígenos, na superfície do virião, e impedindo que os anticorpos primários anti-E^{ms} do *kit* de AgELISA reconheçam e se liguem a esta proteína estrutural. Assim, os anticorpos neutralizantes presentes no soro de um animal previamente vacinado/infectado poderão reagir com os antígenos presentes no soro dos restantes animais do *pool*, dando origem a resultados negativos (Cleveland et al., 2006).

Imunofluorescência (IF)

A detecção de antígeno através de imunofluorescência, em amostras de tecido congelado, também pode ser utilizada como método de diagnóstico (Saliki & Dubovi, 2004). A sensibilidade desta técnica ronda os 77%, sendo a especificidade de cerca de 88% (Brodersen, 2004).

Imunohistoquímica (IHQ)

Idealmente, nenhum tecido proveniente de um ruminante deveria deixar o laboratório de anatomia patológica sem ser submetido a imunohistoquímica (IHQ) para detecção do BVDV (Saliki & Dubovi, 2004). A técnica recorre a anticorpos poli- ou monoclonais (e.g., clone 15C5) para detectar uma ou várias proteínas virais numa variedade de tecidos (e.g., tiróide, osso cérebro, membranas mucosas), congelados ou fixados em formol, podendo ser utilizada no diagnóstico de infecções agudas e persistentes, em animais de qualquer idade (Grooms & Keilen, 2002; Haines, Clark, & Dubovi, 1992; Hilbe et al., 2007; Radostits et al., 2007; Saliki & Dubovi, 2004). A imunohistoquímica pode ser utilizada como um meio de confirmar a infecção pelo BVDV na ausência de isolamento viral, sendo útil na investigação de surtos de doenças do foro entérico, respiratório e reprodutivo (Radostits et al., 2007).

A submissão de amostras de pele (e.g., biópsias de pele de orelha) para detecção do vírus por imunohistoquímica é popular, entre outras coisas, devido à conveniência do método de

colheita das amostras, à robustez do teste, à possibilidade de analisar um grande número de amostras, ao elevado coeficiente de concordância com o isolamento viral, e aos custos relativamente baixos da técnica em comparação com o isolamento viral (Cornish et al., 2005; R. L. Larson et al., 2005; Radostits et al., 2007). A utilização de amostras de pele é particularmente interessante no diagnóstico de infecções persistentes, uma vez que as amostras provenientes de animais TI raramente são positivas à imunohistoquímica, e os padrões de marcação da pele de animais PI e TI são distintos (apesar de sujeitos a subjectividade na interpretação) (Brodersen, 2004; Radostits et al., 2007). A pele dos animais TI apresenta marcação imunohistoquímica multifocal, frequentemente limitada à epiderme e infundíbulo dos folículos pilosos, sendo possível observar marcação de alguns bulbos pilosos (Brodersen, 2004; Njaa et al., 2000). Pelo contrário, a pele dos animais PI apresenta marcação difusa da epiderme e estruturas anexas, com marcação das células dendríticas da derme e, ocasionalmente, dos condrócitos da cartilagem auricular (Brodersen, 2004; Njaa et al., 2000). As glândulas sebáceas e apócrinas podem também exibir marcação ligeira a moderada (Luzzago et al., 2006). Em alguns animais PI, a marcação pode ser menos difusa, tornando a distinção entre animais PI e TI algo difícil (Brodersen, 2004). Os casos duvidosos devem ser sujeitos a re-testagem, algumas semanas após o primeiro teste (Radostits et al., 2007).

A sensibilidade e especificidade desta técnica variam entre os 97 e os 100%, sendo necessário testar os animais apenas uma vez (à excepção dos casos duvidosos) (Brodersen, 2004; Cornish et al., 2005; Smith & Grotelueschen, 2004).

Em manadas com muitos animais PI torna-se mais provável detectar animais TI por imunohistoquímica, possivelmente devido às elevadas quantidades de vírus circulante, eliminadas pelos animais persistentemente infectados para o ambiente (Brodersen, 2004; Njaa et al., 2000). Os resultados obtidos num estudo realizado por DuBois, Cooper, Duffy, Ball, & Starr Jr. (2000) sugerem que a vacinação com vacinas vivas modificadas não dá origem a falsos positivos, quando se utilizam biópsias de pele.

A imunohistoquímica apresenta como principais desvantagens o intenso trabalho laboratorial de preparação, processamento e análise das amostras, e o facto da interpretação dos resultados se basear em critérios subjectivos (Cornish et al., 2005).

Deteção de ARN viral

Os ácidos nucleicos virais podem ser detectados directamente a partir de uma amostra ou após amplificação por PCR. Várias sondas para hibridização foram desenvolvidas no início da década de 90, com o intuito de detectar os ácidos nucleicos do BVDV em várias amostras animais. Contudo, nenhum destes testes foi adaptado para utilização de rotina no diagnóstico de BVD (Saliki & Dubovi, 2004).

RT-PCR

A amplificação por RT-PCR tornou-se uma técnica de rotina no diagnóstico de infecção pelo BVDV (Radostits et al., 2007).

Os protocolos de teste foram refinados, podendo ser aplicados a praticamente todos os tipos de amostra (sangue, soro, leite, urina, tecidos frescos ou fixados em parafina, zaragatoas). Os *primers* utilizados também foram cuidadosamente desenhados para reagir com praticamente todas as quasiespécies. Os ácidos nucleicos amplificados são geralmente detectados por electroforese em gel de agarose, tratado com brometo de etídio. A visualização em tempo-real tornou-se possível, recentemente, com a utilização de sondas fluorogénicas (Saliki & Dubovi, 2004).

A elevada sensibilidade da técnica de RT-PCR permite a análise de *pools* de amostras, de forma a reduzir os custos de testagem de cada animal. Este modelo de testagem é particularmente útil na detecção de animais PI numa manada, já que uma única amostra positiva pode ser detectada num *pool* de várias dúzias de amostras (Radostits et al., 2007).

Os custos desta técnica, e a possibilidade de ocorrência de falsos positivos devido a contaminação laboratorial, são duas desvantagens do RT-PCR. A necessidade de re-testagem dos animais positivos, após 3 semanas, para distinção entre animais PI e TI, constitui uma desvantagem adicional desta técnica (R. L. Larson et al., 2005).

Detecção de anticorpos

Quando bem aplicados, os testes serológicos podem ser utilizados para: determinar a eficácia de uma vacina, averiguar o cumprimento dos protocolos de vacinação, determinar o estatuto de uma manada quanto à exposição ao BVDV, e associar a presença do BVDV com a ocorrência de sinais clínicos (Saliki & Dubovi, 2004). Este tipo de teste requer a colheita de amostras pares, com 2 a 3 semanas de intervalo (teoricamente correspondentes à fase aguda e à fase de convalescença), que devem ser testadas em simultâneo, para confirmar a infecção (Cleveland et al., 2006; Potgieter, 2004).

Vários testes serológicos foram adoptados para a serologia do BVDV. Estes incluem a imunodifusão em gel de agarose, a fixação de complemento, a imunofluorescência indirecta, a neutralização viral (NV), o ELISA para detecção de anticorpos (AcELISA) e o *Western blotting* (Sandvik, 1999).

Imunodifusão em gel de agarose

A técnica de imunodifusão em gel de agarose detecta primariamente anticorpos anti-NS2-3, sendo pouco sensível na detecção do BVDV. A sensibilidade do teste de fixação de complemento é igualmente baixa, mas pode ser útil na detecção precoce de anticorpos nos animais em processo de seroconversão (Sandvik, 1999).

Neutralização viral (NV)

A técnica mais comum de detecção de anticorpos anti-BVDV é a neutralização viral (Saliki & Dubovi, 2004). Esta constitui o teste padrão para detecção da elevação dos títulos de anticorpos entre o soro de animais em plena infecção aguda e o de animais convalescentes. Durante uma infecção aguda, os anticorpos anti-BVDV atingem níveis detectáveis às 2 a 3 semanas pós-infecção, atingindo o seu pico 8 a 10 semanas após a infecção. O título de anticorpos neutralizantes mantém-se elevado durante vários meses após vacinação bem sucedida (Radostits et al., 2007).

Os animais persistentemente infectados são seronegativos, com excepção daqueles que ainda possuam anticorpos colostrais e dos que tenham contactado com um isolado antigenicamente heterólogo do BVDV (Collen et al., 2000; Radostits et al., 2007). Os anticorpos colostrais duram até 8 meses em animais saudáveis e até 3 meses em animais PI (Fulton et al., 2004; Mockeliuniene et al., 2004).

Geralmente, não são detectados anticorpos anti-BVDV nos animais com Doença das Mucosas, exceptuando-se os casos de Doença das Mucosas de Início Tardio (Fritzemeier et al., 1997; Radostits et al., 2007).

Os animais infectados *in utero* após o desenvolvimento da imunocompetência poderão apresentar anticorpos neutralizantes pré-colostrais, sendo a sua demonstração importante para o diagnóstico de infecções congénitas (Radostits et al., 2007).

A neutralização viral apresenta como desvantagem o facto de os resultados obtidos por esta técnica variarem consideravelmente entre diferentes laboratórios, em consequência das diferentes estirpes e culturas de células utilizadas por cada laboratório (Saliki & Dubovi, 2004). Como o principal “alvo” dos anticorpos neutralizantes anti-BVDV é a proteína de superfície E2, uma das mais variáveis proteínas de superfície, os testes de neutralização viral tendem a ser específicos para um dado isolado do vírus (Potgieter, 2004). Adicionalmente, esta técnica pressupõe um investimento substancial na selecção e monitorização de culturas celulares e meios de cultura (Sandvik, 1999).

ELISA para detecção de anticorpos (AcELISA)

Os testes de ELISA para detecção de anticorpos representam uma alternativa rápida e económica à neutralização viral. Os resultados obtidos com este tipo de teste apresentam uma boa correlação com os obtidos na neutralização viral, podendo ser úteis na testagem de grandes números de animais e programas de erradicação. O nível de anticorpos anti-BVDV no leite, detectados através da utilização de um teste ELISA de bloqueio, é um indicador valioso do *status* infeccioso de uma exploração de leite. Em combinação com o RT-PCR, o AcELISA pode ser utilizado para estimar a prevalência de fêmeas lactantes persistentemente infectadas numa exploração (Radostits et al., 2007).

Entre as principais limitações do AcELISA na serologia do BVDV encontram-se os elevados e variáveis “sinais de fundo”, causados por contaminações no antígeno em teste ou por reactividade cruzada das imunoglobulinas conjugadas, que resultam em baixos rácios sinal/ruído (Potgieter, 2004; Sandvik, 1999).

Adicionalmente, esta técnica não apresenta resultados satisfatórios em neonatos, devido à presença de anticorpos colostrais (Grooms & Keilen, 2002).

Imunofluorescência indirecta (IFI)

A imunofluorescência indirecta (IFI) é uma técnica sensível e específica, semelhante ao AcELISA. Contudo, o facto de pressupor uma leitura manual torna-a demasiado morosa quando se pretende testar um grande número de amostras. Não obstante esta desvantagem, a IFI constitui uma alternativa para testar soros que sejam citotóxicos para culturas de células ou que gerem muitas reacções cruzadas no AcELISA (Sandvik, 1999).

Western Blotting

A técnica de *Western blotting* é tecnicamente semelhante a alguns AcELISA, providenciando mais informações sobre a especificidade molecular dos anticorpos (Sandvik, 1999).

Tratamento, Prevenção, Controlo

Não existe tratamento específico para qualquer das doenças associadas à infecção pelo vírus da Diarreia Bovina Viral. O prognóstico para animais com casos severos de Doença das Mucosas, com diarreia aquosa profusa e lesões orais graves, é desfavorável e o abate destes animais deve ser considerado. Animais com BVD crónica devem ser refugados e destruídos (Radostits et al., 2007).

O principal objectivo do controlo do vírus da Diarreia Bovina Viral reside na redução das perdas de produção associadas à infecção de uma manada pelo BVDV. Isto torna-se possível através da implementação de programas sanitários, que visam limitar a exposição ao vírus, evitando a presença de animais portadores persistentemente infectados e reforçando a imunidade através da vacinação (Kelling, 2004). A eliminação do potencial para o nascimento de animais persistentemente infectados constitui uma das maiores preocupações na criação destes programas (Brock, 2004; Radostits et al., 2007).

Veterinários e produtores devem encontrar-se verdadeiramente empenhados em adaptar as suas práticas de gestão, de forma a permitir que estas medidas integrem o seu padrão de actuação, entre outras razões, devido ao extraordinário desafio que a criação de programas eficazes de biossegurança – evasão à entrada do vírus na exploração - e biocontenção – controlo da doença ou remoção dos animais infectados - para o vírus da Diarreia Bovina Viral representa (Brock, 2004; Smith & Grotelueschen, 2004).

É necessário um profundo conhecimento da prevalência do BVDV para identificar as manadas infectadas pelo vírus, assim como aquelas que se encontram susceptíveis à infecção (Sandvik, 2004).

A decisão de implementar uma estratégia de biossegurança/biocontenção para o BVDV deverá ser baseada numa rigorosa análise do risco, a qual deve incluir uma análise de custo-benefício. Os custos associados a estas estratégias incluem os testes, o tempo e mão-de-obra dispendidos na colheita de amostras e manutenção de registos, a preparação de instalações para separação e manejo dos animais de modo a prevenir a transmissão. Os benefícios da remoção do vírus da Diarreia Bovina Viral incluem a redução das perdas associadas à morte e à doença, e o aumento da produtividade e da *performance* reprodutiva. Em certos sistemas produtivos, a demonstração da ausência de animais PI poderá resultar num aumento do valor comercial dos reprodutores ou de animais destinados a outros sistemas produtivos (e.g., explorações de acabamento) (Smith & Grotelueschen, 2004). O reconhecimento da importância do BVDV, pela indústria produtora de gado bovino, pode estimular os produtores a adoptar medidas de biossegurança, e programas de vacinação e/ou de eliminação de animais persistentemente infectados (Brock, 2004).

Contudo, deve ser tida em consideração a possibilidade de existirem sistemas de produção em que não é possível o controlo da exposição ao BVDV (e.g., pastoreio simultâneo de

diferentes manadas, ou contactos entre animais de explorações limítrofes) (Smith & Grotelueschen, 2004).

O objectivo de um programa de biossegurança para o BVDV reside na prevenção da introdução do vírus na manada, e sua transmissão a animais susceptíveis, quer através de fomites, produtos biológicos e contacto com animais externos à exploração, quer através da aquisição de animais infectados (Smith & Grotelueschen, 2004). Idealmente, a aquisição de animais provenientes de explorações livres do BVDV, juntamente com a compra de animais comprovadamente não-PI, eliminaria o risco de exposição ao vírus pela última via (Brock, 2004; D. R. Smith, 2002). Em tal não sendo possível, a quarentena, durante 2 a 3 semanas, de todos os animais recém-adquiridos, pode auxiliar na prevenção da exposição dos animais residentes a animais TI recentemente introduzidos (Brock, 2004; D. R. Smith, 2002). Cada nova aquisição deve ser testada para detecção de animais persistentemente infectados, antes da sua chegada à exploração ou durante o período de quarentena, para que estes reservatórios primários do vírus possam ser removidos antes de serem adicionados à manada residente (Brock, 2004; Smith & Grotelueschen, 2004). Fêmeas gestantes recentemente adquiridas não devem parir juntamente com as fêmeas gestantes residentes, e os seus filhos devem ser isolados até que tenham sido testados e declarados não-PI (Brock, 2004; Smith & Grotelueschen, 2004).

Nos casos em que já tenha sido confirmada a presença de BVDV circulante no seio de uma manada, os esforços deverão divergir para a biocontenção do vírus e para a criação de um plano de minimização dos custos relacionados com a infecção, ou de eliminação do vírus da manada (Figura 4) (Smith & Grotelueschen, 2004).

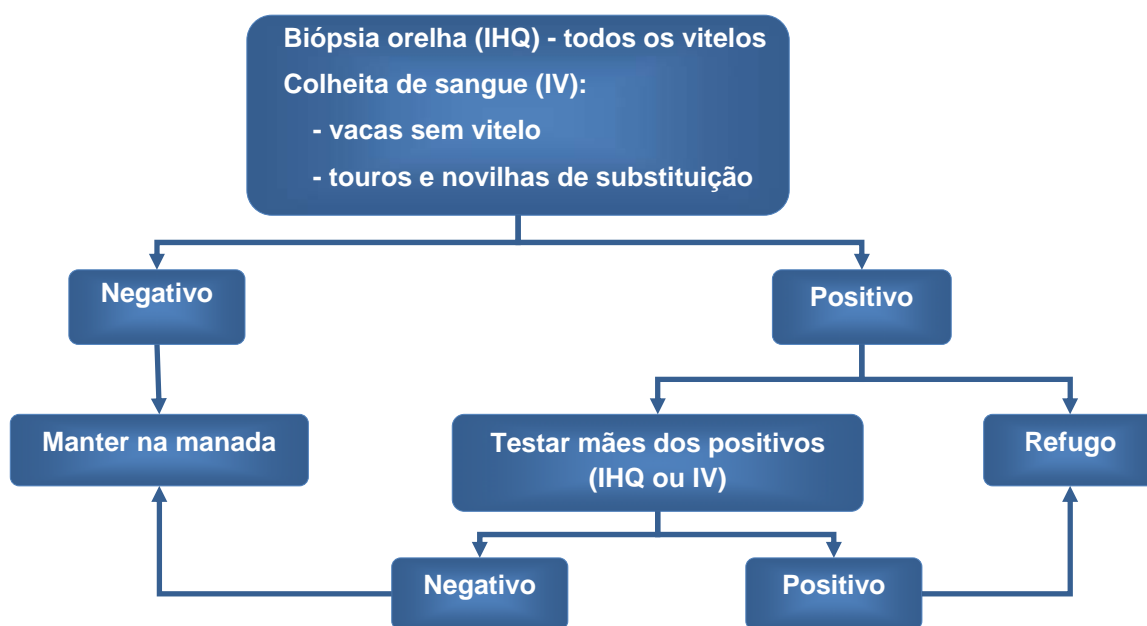


Figura 4. Diagrama de uma estratégia de testagem a ser utilizada na presença de BVDV circulante na exploração (adaptado de Brock, 2004).

Legenda: IHQ, imunohistoquímica; IV, isolamento viral

Uma vez que os animais persistentemente infectados constituem a maior ameaça de disseminação contínua do vírus, a maioria das estratégias de vigilância aposta na detecção e remoção destes animais da manada (Smith & Grotelueschen, 2004).

Permitir a presença de um único animal persistentemente infectado na manada é o suficiente para comprometer todos os esforços de biocontenção do vírus. A utilização de um teste de elevada sensibilidade e especificidade possibilitaria a determinação do estatuto de uma manada, em relação à presença ou ausência do BVDV, através da testagem de todos os animais para detecção de PI (Figura 5). Apesar de ser essencial a obtenção de informação diagnóstica relativa a cada um dos animais da manada, para uma detecção eficaz de animais persistentemente infectados, este tipo de estratégia de vigilância revela-se, contudo, dispendioso e demorado (Smith & Grotelueschen, 2004).

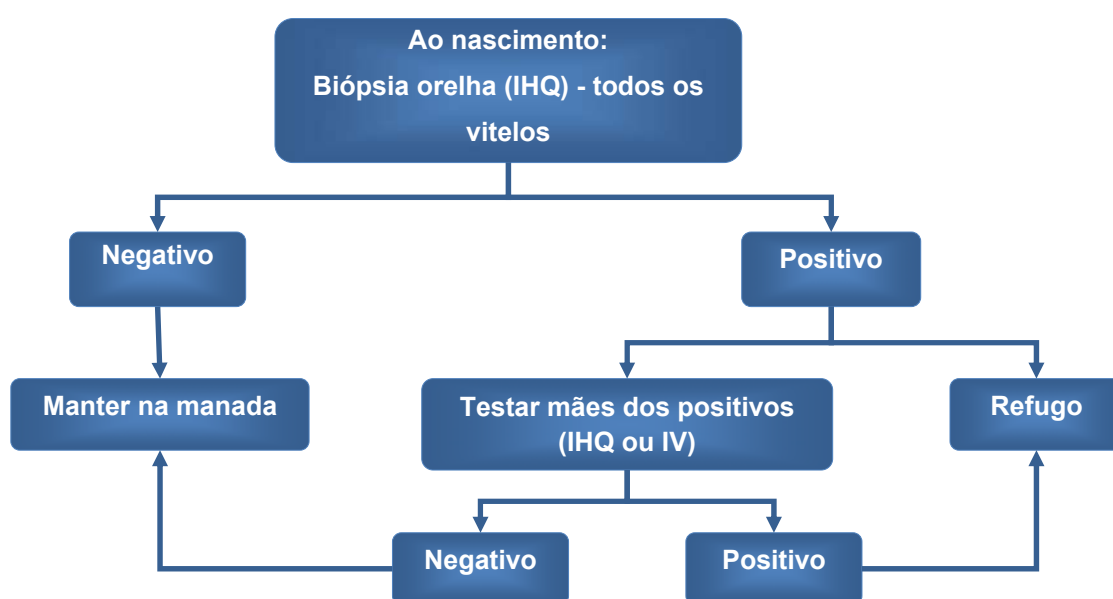


Figura 5. Diagrama de uma estratégia de testagem de rotina para pesquisa de animais PI (adaptado de Brock, 2004).

Legenda: IHQ, imunohistoquímica; IV, isolamento viral

Numa exploração de bovinos leiteiros em que não sejam aplicadas vacinas contra o BVDV, a utilização de testes ELISA para detecção de anticorpos anti-BVDV em amostras do leite resultante da ordenha, constitui uma boa opção para a detecção de infecções pelo vírus (Sandvik, 2004). Nas explorações em que é praticada a vacinação, a pesquisa de anticorpos em animais-sentinela, não-vacinados, entre os 8 e os 12 meses de idade (após o desaparecimento dos anticorpos maternos), poderá proporcionar as informações necessárias sobre a circulação do vírus na manada (Sandvik, 2004; Smith & Grotelueschen, 2004). Teoricamente, um animal que, não tendo sido vacinado, se apresenta seropositivo, deverá ter desenvolvido anticorpos anti-BVDV após uma infecção transitória pelo vírus circulante. Assim, a presença de um animal-sentinela seropositivo leva à classificação da manada como BVDV-positiva (Smith & Grotelueschen, 2004).

A vantagem de uma estratégia de vigilância baseada na utilização de animais-sentinela é a sua eficiência no diagnóstico de infecções resultantes da exposição a animais TI e PI. No entanto, a presença de anticorpos maternos permanece um desafio na interpretação dos resultados dos exames serológicos, e a idade a que os vitelos se tornam seronegativos tende a ser variável (Smith & Grotelueschen, 2004).

Nas explorações de bovinos com aptidão carne, o principal método de monitorização serológica consiste na utilização destes animais-sentinela (Sandvik, 2004).

Tal como a testagem individual e o refugo dos animais PI, a monitorização da prevalência do vírus através de testes serológicos deverá ser realizada regularmente, de forma a avaliar o resultado da estratégia de testagem-refugo e actualizar os dados da prevalência do BVDV na população (Sandvik, 2004). A informação obtida a partir dos vitelos poderá ser utilizada para determinar o *status* infeccioso das suas mães, uma vez que as fêmeas PI dão invariavelmente origem a descendência PI (Smith & Grotelueschen, 2004).

Os exames de diagnóstico actualmente disponíveis, quando utilizados por clínicos experientes, permitem a erradicação da Diarreia Bovina Viral apenas através da detecção e remoção dos animais persistentemente infectados, sem a utilização de vacinas (Sandvik, 2004). Não obstante a existência de tal possibilidade, a transmissão do BVDV inter- e intra-manadas pode ser reduzida através de programas de vacinação adequados (Brock, 2004).

Devido à variabilidade antigénica entre as estirpes de BVDV-1 e BVDV-2, foram desenvolvidas vacinas que contêm ambos os genótipos do vírus, como forma de assegurar a protecção contra a infecção sistémica pelo mesmo (Kelling, 2004).

Não existe uma vacina *standard* para o BVDV, encontrando-se disponíveis no mercado diversas preparações comerciais, pertencentes a uma de duas classes: vacinas vivas modificadas e vacinas inactivadas (OIE, 2008).

A principal vantagem das vacinas vivas modificadas, em geral, é a activação de todas as divisões do sistema imunitário, resultando numa resposta imunitária local e sistémica, tanto humoral como celular, e estimulando a produção de elevadas concentrações de anticorpos neutralizantes (Kelling, 2004). A segurança deste tipo de vacinas constitui uma preocupação, já que os animais vacinados desenvolvem uma virémia transitória e eliminam partículas virais nas secreções nasais durante vários dias, correspondentes ao período de virémia (Fulton, Saliki, Burge, & Payton, 2003; Kelling, 2004). Não parece existir transmissão do vírus vacinal entre vitelos vacinados e vitelos susceptíveis (Fulton et al., 2003). As vacinas vivas modificadas não devem ser administradas a fêmeas gestantes (ou às suas crias lactentes), devido ao risco de infecção transplacentária. Existe ainda o risco de indução de Doença das Mucosas em animais persistentemente infectados (OIE, 2008).

O maior benefício das vacinas inactivadas é a sua segurança, uma vez que não são, nem imunossupressoras, nem patogénicas para os fetos. As desvantagens deste tipo de vacinas incluem títulos de anticorpos neutralizantes mais baixos e períodos menores de protecção

imunitária, que obrigam a que sejam administradas com maior frequência. Adicionalmente, as vacinas inactivadas tendem a desencadear respostas de células T citotóxicas mais fracas, quando comparadas com as vacinas vivas modificadas (Kelling, 2004).

Embora existam variações entre os títulos de anticorpos neutralizantes induzidos por vários tipos de vacinas anti-BVDV inactivadas e vivas-modificadas, a vacinação reduz a virémia e a transmissão do vírus, reduzindo ainda as perdas resultantes das doenças secundárias à infecção pelo BVDV (Brock, 2004).

Em Portugal, encontram-se disponíveis no mercado ambas as classes de vacina (viva modificada e inactivada), baseadas tanto em estirpes citopáticas como em estirpes não-citopáticas (Apifarma, 2007).

Além da resposta imunitária gerada pela vacina, da reactividade cruzada e da duração da imunidade, é necessário considerar outros factores na escolha da(s) vacina(s) a utilizar, como, por exemplo, a eficácia na protecção fetal (Kelling, 2004).

O propósito principal dos programas vacinais para animais reprodutores deve ser a prevenção da infecção fetal, algo mais difícil de concretizar que a prevenção da doença clínica decorrente de infecções transitórias (Brock, 2004). Não é, contudo, impossível que uma fêmea vacinada venha a gerar descendência PI, após exposição ao BVDV nos primeiros meses de gestação (Brock, 2004; Rodning et al., 2010). Os estudos efectuados para averiguar a eficácia das vacinas actualmente disponíveis, na protecção dos fetos contra a infecção por estirpes de campo do vírus da Diarreia Bovina Viral, demonstram que, apesar de estas vacinas providenciarem uma protecção significativa dos fetos contra a infecção, esta não deixa de ser incompleta, existindo casos de vitelos persistentemente infectados nascidos de fêmeas vacinadas (Brock, 2004; Kelling, 2004; Rodning et al., 2010). Por outras palavras, em algumas fêmeas gestantes, a quantidade de viriões que escapa, no decurso da infecção, à inactivação pelos anticorpos circulantes, produzidos em resposta ao vírus vacinal, é suficiente para causar infecção transplacentária, aborto ou desenvolvimento de infecções persistentes. Assim, a utilização de programas de vacinação não substitui nem exclui os programas de testagem e refugo, no controlo adequado do BVDV (Brock, 2004).

A vacinação de touros no período peri-pubertal, com vacinas vivas-modificadas, previne o estabelecimento de infecções testiculares crónicas, na sequência de infecções por estirpes de campo do vírus (Givens, Riddell, Zhang et al., 2009).

Com a aplicação de estratégias de prevenção e controlo da Diarreia Bovina Viral, torna-se vital a verificação das medidas adoptadas e sua eficácia (Brock, 2004). À medida que a prevalência da infecção pelo BVDV diminui, torna-se também essencial assegurar que o vírus não é re-introduzido em populações susceptíveis, uma vez que as manadas recentemente livres do BVDV tendem a tornar-se gradualmente mais susceptíveis à reinfeção, e a probabilidade de ocorrência de um surto de doença com sinais clínicos severos devido a uma

nova exposição ao vírus é maior (Brock, 2004; Cherry, Reeves, & Smith, 1996; Innocent, Morrison, Brownlie, & Gettinby, 1997; Sandvik, 2004; Smith & Grotelueschen, 2004).

Uma fonte comum de re-infecção é a re-introdução accidental do vírus a partir de manadas vizinhas infectadas. A possibilidade e risco do contacto directo ou indirecto com animais em período infeccioso de outras manadas deverão ser avaliados. Todos os animais de substituição (e respectivos fetos) a introduzir numa manada livre de BVDV deverão, também, ser mantidos em quarentena, até que sejam testados e considerados livres do vírus, a menos que o seu estatuto infeccioso tenha sido previamente comprovado (Sandvik, 2004). As possíveis fontes de re-infecção restantes, como o sémen, embriões, colostro e fármacos devem ser, igualmente, verificados antes da sua utilização, tal como deve ser monitorizada a possibilidade de contaminação do vestuário, equipamentos e outras fomites, pelo BVDV (Gard et al., 2007; Givens, Riddell, Edmondson et al., 2009; Givens & Waldrop, 2004; Gunn, 1993). É, ainda, aconselhável a disponibilização de recomendações sobre a utilização de desinfetantes, para os produtores, organizações de comércio e empresas de transporte de animais (Sandvik, 2004).

A organização dos esforços para o controlo da Diarreia Bovina Viral, a nível nacional, carecerá, eventualmente, de medidas legislativas ou quaisquer outros meios de regulamentação do movimento livre de animais potencialmente virémicos. Inicialmente, estas medidas poderão apenas ser solicitadas por produtores que tenham eliminado o vírus das suas explorações, ou por criadores de gado reprodutor interessados em promover o estatuto sanitário dos seus animais. Contudo, é possível que, posteriormente, se torne mesmo obrigatória a apresentação de um certificado comprovativo da ausência do BVDV na exploração, para que um produtor possa ter acesso a leilões/exposições de gado ou pastos comunitários. Na eventualidade de ser considerada a implementação de um esquema de controlo do vírus da Diarreia Bovina Viral a nível nacional, o mesmo deverá ser adaptado à epidemiologia do BVDV e aos sistemas de produção do país em questão, incluindo a densidade populacional e o maneio reprodutivo (Sandvik, 2004).

Trabalho

Experimental

Objectivos

O objectivo deste trabalho experimental consistiu em utilizar imunohistoquímica e AgELISA para detectar animais com infecções persistentes pelo vírus da Diarreia Bovina Viral, em bovinos de engorda, através da pesquisa de antigénios do vírus em amostras de pele de orelha.

Materiais e métodos

Animais

Foram colhidas amostras de 100 animais de quatro explorações de bovinos de engorda, com idades compreendidas entre as 2 e as 84 semanas de idade (Tabela 3). Os animais foram seleccionados de forma aleatória, à entrada na engorda.

Tabela 3. Número de amostras colhidas por local de colheita e raça dos animais.

Localização da exploração	Raça	Número de amostras
Alenquer	Cruzado de Carne	32
	Mertolenga	1
Estremoz	Tipo Frísia	25
Pegões	Tipo Frísia	28
Torres Vedras	Cruzado de Carne	14

Obtenção e processamento das amostras

Foram obtidas amostras de pele de orelha dos animais em estudo. Dada a natureza da intervenção e do tecido colhido, não foi considerada necessária ou vantajosa a sedação dos animais, nem a utilização de anestesia local. As amostras foram colhidas com recurso a biótomos (*punch*) descartáveis, de 8 milímetros de diâmetro, e imediatamente divididas em duas metades, utilizando-se um bisturi e lâminas descartáveis para o efeito. Uma metade foi colocada em refrigeração e a metade restante foi fixada em formol tamponado a 10% (Figuras 6 e 7). As amostras colhidas para imunohistoquímica foram sujeitas a fixação em formol durante 24 horas, e subsequentemente encaminhadas para processamento histológico de rotina (Anexo III).

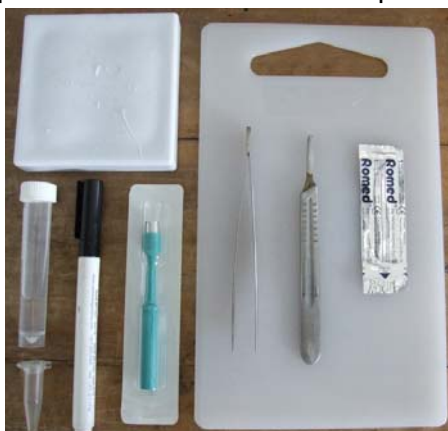
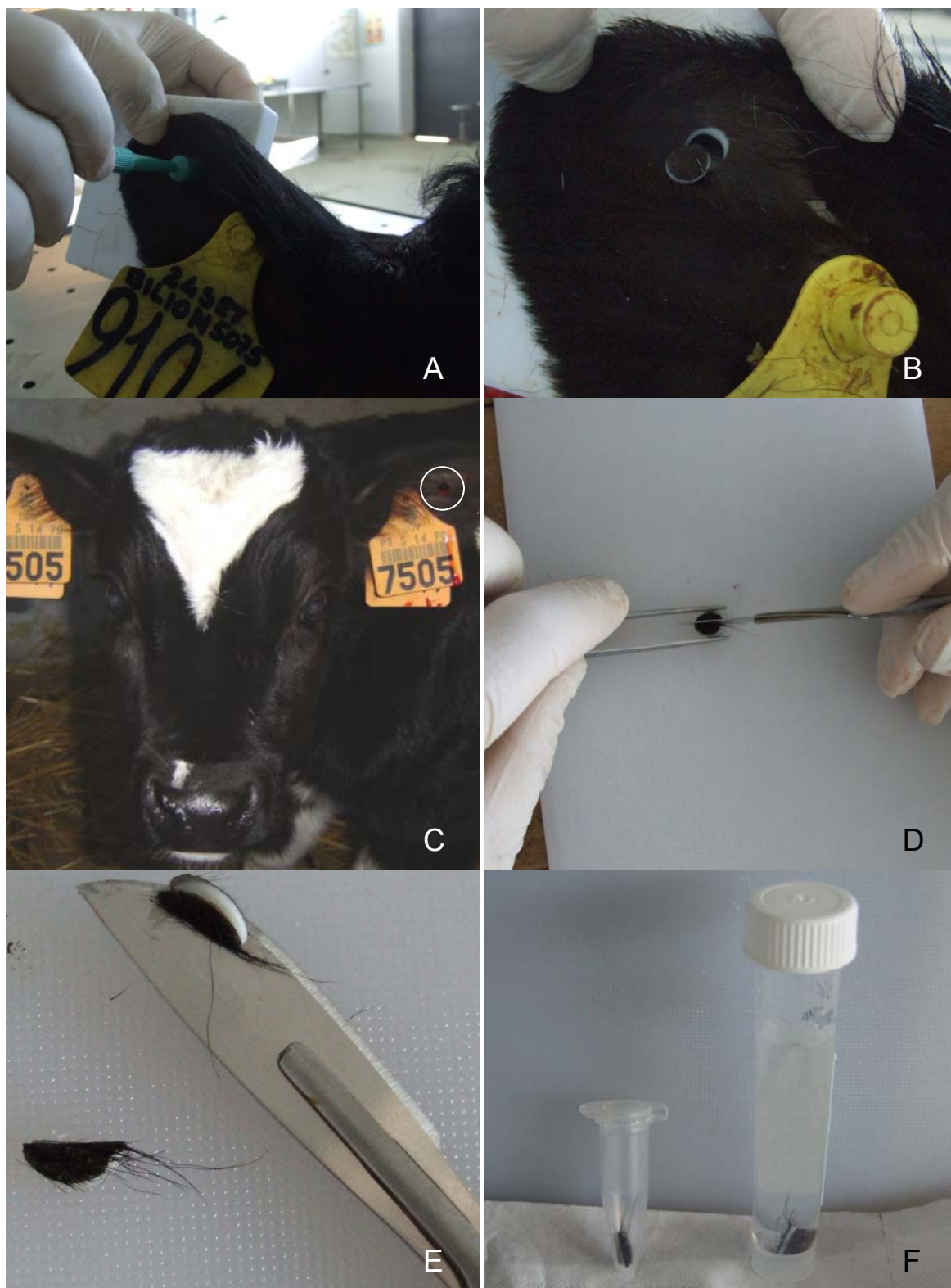


Figura 6. Material utilizado na colheita de amostras.



Figuras 7 (A a F) Fotografias do acto de colheita das amostras de pele.

AgELISA

Todas as amostras foram armazenadas, processadas e analisadas de acordo com as recomendações do fabricante, inclusas no *kit* comercial de ELISA para detecção de antígeno viral utilizado (*HerdChek BVDV Antigen Serum Plus*, IDEXX) (Figura 8) (Anexo IV). Este *kit* baseia-se na pesquisa da proteína estrutural E^{ns} do vírus da Diarreia Bovina Viral, em amostras de sangue, soro, plasma ou pele de orelha de bovino, para confirmação da infecção. Cada ensaio foi validado, segundo os critérios fornecidos com o *kit*, e as leituras de absorvância obtidas (a 450nm) foram corrigidas e interpretadas de acordo com os valores de *cutoff* pré-estabelecidos pelo fabricante (Anexo IV).

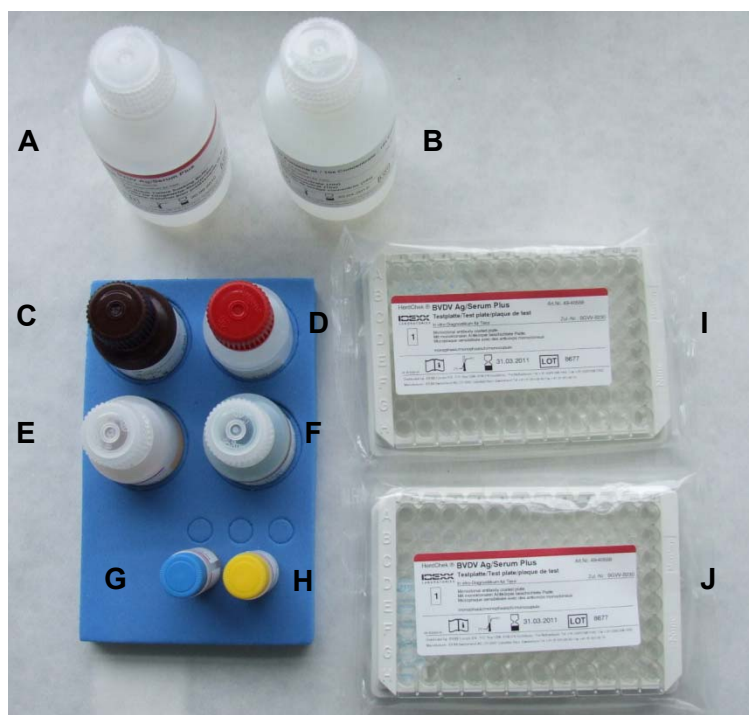


Figura 8. Placas e reagentes incluídos no kit AgELISA utilizado.

Legenda: A, Tampão de maceração; B, Tampão de lavagem; C, Solução de Substrato TMB; D, Solução *Stop*; E, Solução de Detecção; F, Conjugado; G, Controle negativo; H, Controle positivo; I e J, Placas de 96 pocilhos revestidos com anticorpo anti-E^{ns}

Imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica foi efectuada nas referidas amostras, juntamente com tecidos-controlo, tendo sido efectuados cortes de cerca de 3µm, posteriormente montados em lâminas *SUPERFROST® PLUS* (*Thermo scientific*). As lâminas foram colocadas em estufa a 60°C, durante 12 horas, para uma completa aderência dos cortes às mesmas.

Todas as amostras foram testadas segundo o protocolo descrito no Anexo V. Como controlo positivo, foram utilizados cortes de intestino de um caso comprovado de Doença das Mucosas. Como controlo negativo, utilizaram-se cortes do mesmo órgão, que foram submetidos a incubação com TBS, em substituição do anticorpo primário. Todos os cortes

foram submetidos a recuperação antigénica com Proteinase K (Zymed), à temperatura ambiente. O bloqueio de reacções inespecíficas foi efectuado com uma solução comercial apropriada (*Protein Block*, Novocastra). Como soro primário, foi seleccionado um soro policlonal anti-BVDV comercial (VMRD), de origem caprina, utilizado na diluição de 1:1600, em TBS. O bloqueio da peroxidase endógena foi efectuado por imersão em 3% H₂O₂ em água corrente, após o que se seguiu o tratamento com um sistema de detecção comercial (*Vectastain® Elite ABC Kit (Goat IgG)*, *Vector Labs*), alterado de forma a eliminar as reacções inespecíficas atribuíveis ao anticorpo secundário (ver Anexo V). Finalmente, a revelação foi efectuada com diaminobenzidina (DAKO) e o contraste nuclear com hematoxilina de Mayer. Como tampão de lavagem, foi utilizado PBS, pH 7,3.

Resultados

AgELISA

Nenhum dos animais testados foi identificado como estando persistentemente infectado pelo vírus da Diarreia Bovina Viral. Todas as amostras analisadas pela técnica de ELISA para captura de antígeno geraram leituras abaixo do valor estabelecido pelo fabricante como indicando positividade, para o tipo de amostra utilizado (valor corrigido de absorvância a 450nm $<0,300$) (Figura 9).

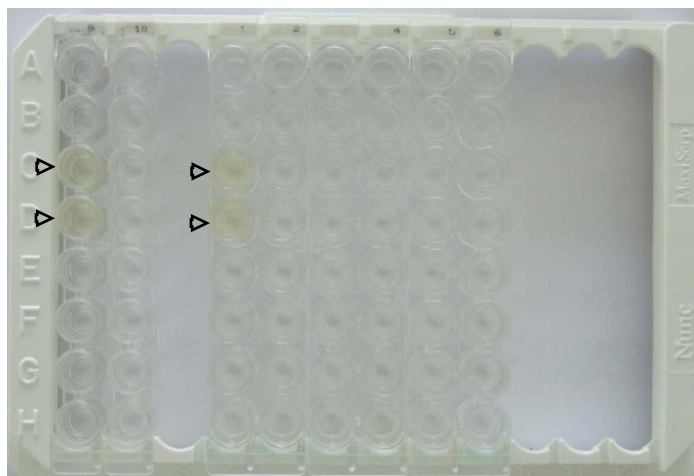


Figura 9. Placa de AgELISA, exibindo resultados negativos.

Nota: Os pocilhos de coloração mais intensa, indicados pelas cabeças de seta, correspondem aos controles positivos

Imunohistoquímica

Nenhuma das amostras testadas por imunohistoquímica exibiu um padrão de marcação compatível com os padrões descritos na literatura disponível, como estando associados a infecção persistente. Oitenta e oito das cem amostras analisadas revelaram ausência de qualquer marcação imunohistoquímica para o vírus da Diarreia Bovina Viral (Figura 10). Todavia, 12 das amostras analisadas exibiram padrões de marcação multifocal, sob a forma de fina granulação de cor castanho-escuro, de localização citoplasmática, limitada às células da epiderme e do infundíbulo dos folículos pilosos (Figura 11). Nas lâminas de controle positivo, a marcação imunohistoquímica observada consistiu na mesma granulação castanho-escuro, de localização perinuclear, presente nas células intestinais, tanto nas vilosidades como nas glândulas (Figura 12). Nas lâminas correspondentes ao controle negativo, a ausência de marcação produziu imagens semelhantes às patentes na Figura 10.

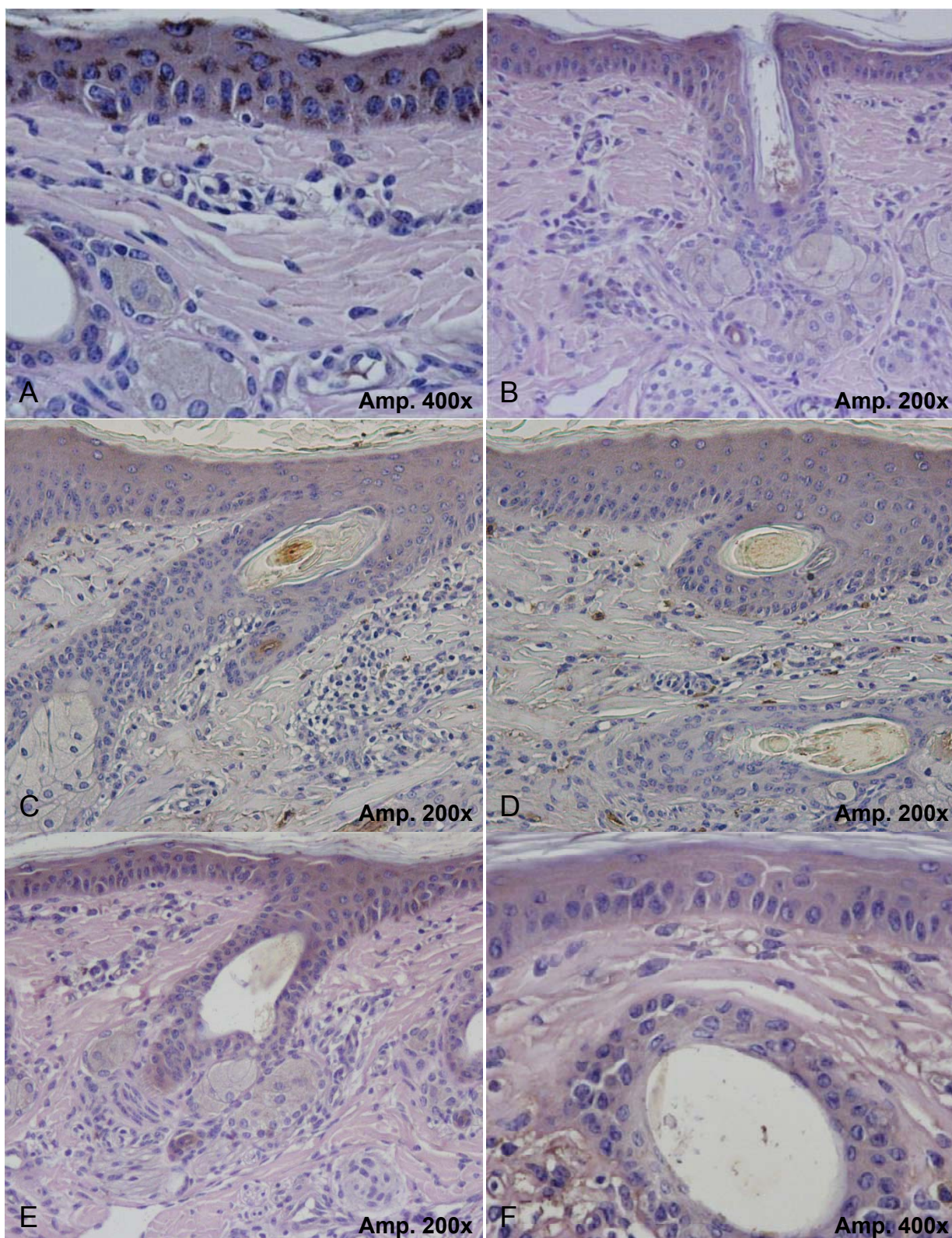


Figura 10. (A a F) Exemplos de casos negativos à imunohistoquímica para detecção do BVDV (ABC, Hematoxilina de Mayer).

Nota: Observe-se, em todas as fotografias, ausência de marcação na epiderme, folículos pilosos e glândulas sebáceas. A fotografia A foi deliberadamente incluída, com o propósito de fazer notar o aspecto, ao microscópio, do pigmento melânico que, à primeira vista, e em baixa ampliação, poderia ser confundido com marcação positiva.

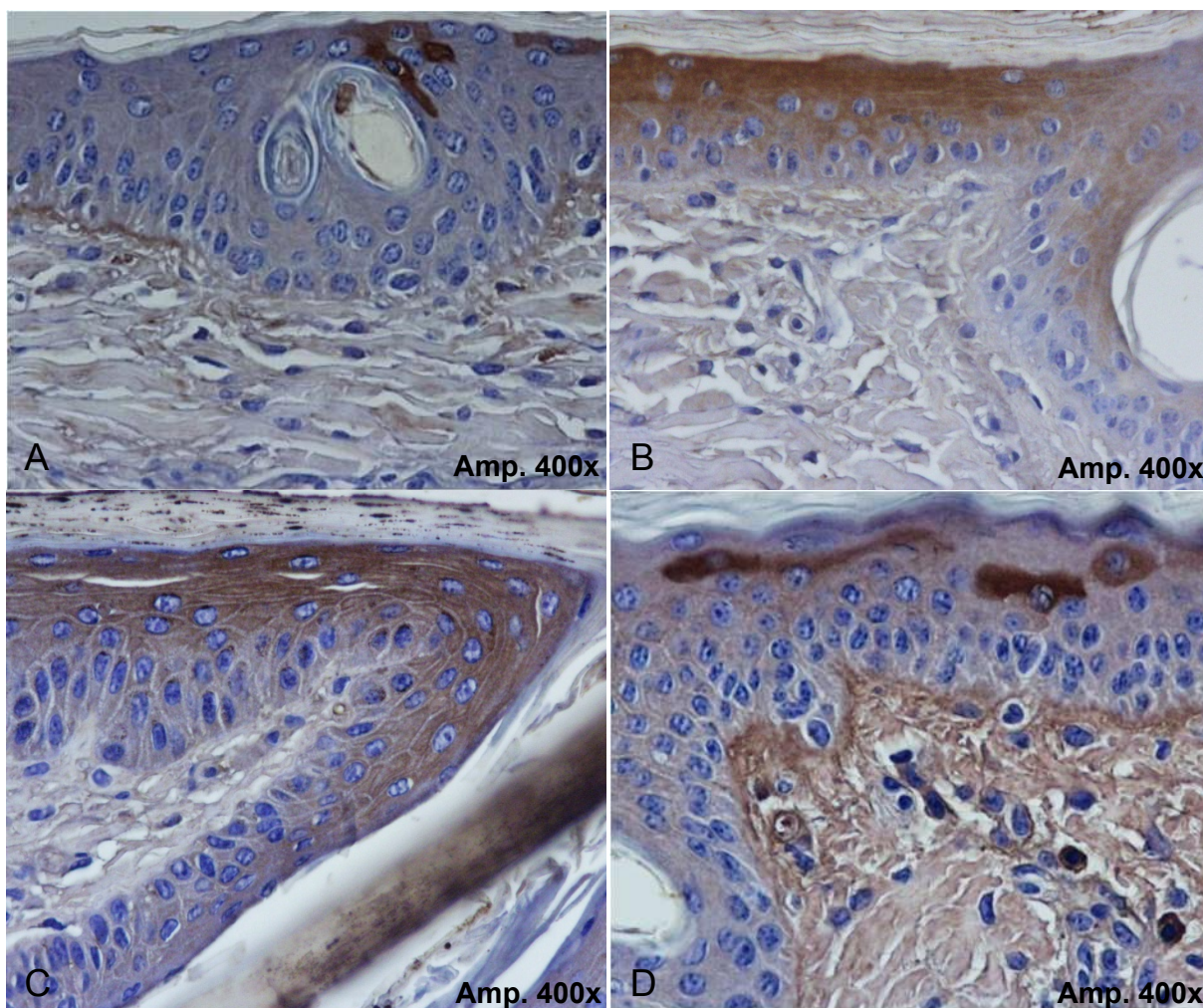


Figura 11. (A a D) Exemplos de padrões de marcação multifocal por imunohistoquímica (ABC, Hematoxilina de Mayer).

Nota: Observe-se o padrão de marcação multifocal, com positividade em algumas zonas da epiderme e ausência de marcação noutras. A marcação imunohistoquímica assume a forma de fina granulação citoplasmática castanho-escuro, limitada às células da epiderme e do infundíbulo dos folículos pilosos

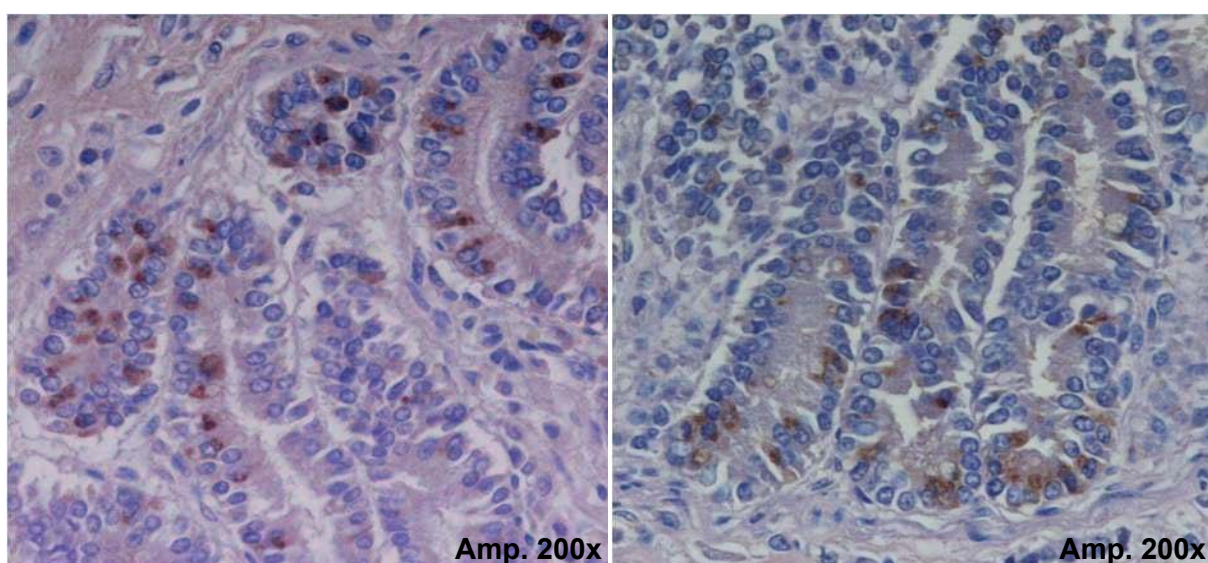


Figura 12. Imagens microscópicas de intestino com marcação positiva para BVDV, utilizado como controlo positivo (ABC, Hematoxilina de Mayer).

Discussão

O leque de quadros sintomáticos causados pelo BVDV dificulta em muito o diagnóstico das infecções por este vírus (Radostits et al., 2007).

A diversidade de manifestações clínicas e de métodos de diagnóstico obriga a que o clínico adquira um profundo conhecimento da doença e das técnicas disponíveis para que possa diagnosticar, da forma mais rápida e económica, a infecção pelo BVDV (Saliki & Dubovi, 2004).

Isto aplica-se especialmente à infecção *in utero* e aos animais persistentemente infectados, cuja presença numa manada tem o potencial de causar graves prejuízos económicos (Campbell, 2004).

A necessidade de identificar estes animais, tão rápida e economicamente quanto possível, gera uma segunda necessidade: a de encontrar a técnica de diagnóstico “ideal”, sensível, específica, económica, rápida, aplicável a um grande número de animais e a animais de qualquer idade (Sandvik, 2004).

Adicionalmente, é desejável que esta não obrigue à re-testagem dos animais, algumas semanas mais tarde, para confirmação do diagnóstico (Radostits et al., 2007).

Neste estudo, foram utilizadas duas técnicas de diagnóstico, descritas na literatura consultada como sendo, tanto sensíveis como específicas, na detecção de animais persistentemente infectados (Brodersen, 2004; Cornish et al., 2005). Ambas se baseiam na detecção de antígeno viral em amostras de pele, sendo aplicáveis a grande número de animais (de qualquer idade) e pressupondo uma única testagem dos mesmos (Cornish et al., 2005; Grooms & Keilen, 2002; R. L. Larson et al., 2005).

Os resultados obtidos pela técnica de AgELISA reproduziram e confirmaram aqueles obtidos por IHQ, não permitindo a classificação de qualquer dos animais testados como persistentemente infectado. Apesar de ter sido observada marcação imunohistoquímica em 12 casos, esta traduziu-se em padrões de marcação multifocal, anteriormente descritos como compatíveis com infecções agudas, ou transitórias (Brodersen, 2004). O facto das amostras em causa terem obtido resultados negativos ao AgELISA reforça a suspeita de que os padrões de marcação observados sejam devidos a infecções transitórias.

A percentagem de casos com padrão de marcação imunohistoquímica compatível com infecções transitórias, parece ser relativamente elevada (12%), considerando que a bibliografia consultada descreve tais casos como raros (Brodersen, 2004; Radostits et al., 2007).

No entanto, grande parte da literatura consultada durante a elaboração deste estudo encontra-se baseada na utilização de anticorpos monoclonais (e.g., clone 15C5) para a detecção do vírus. Pelo contrário, por motivos de disponibilidade de mercado, o soro anti-BVDV utilizado neste estudo era de natureza policlonal, pelo que é possível que esta

diferença tenha exercido alguma influência sobre os resultados obtidos. O número relativamente pequeno de animais testados poderá também ter influenciado estes resultados. A bibliografia consultada sugere que a prevalência de animais persistentemente infectados pode exercer alguma influência sobre o número de infecções agudas detectadas à imunohistoquímica. Assim, uma elevada prevalência de animais PI numa exploração causará um aumento no número de animais TI detectados por IHQ (Brodersen, 2004).

Tanto quanto foi possível averiguar, esta prevalência não se encontra determinada nas explorações em teste, ou mesmo em Portugal, pelo que não é possível estimar até que ponto é que esta poderá ter interferido com a percentagem de animais TI detectados durante a elaboração deste estudo.

Estes doze casos constituem, contudo, um bom exemplo de complementaridade entre as duas técnicas utilizadas, uma vez que os resultados obtidos ao AgELISA proporcionaram uma confirmação da suspeita gerada pelo padrão de marcação obtido à imunohistoquímica.

Não é demais recordar que não existe um teste único para o diagnóstico de infecções (transitórias ou persistentes) pelo BVDV e que, apesar de elevados, os valores de sensibilidade e especificidade destas técnicas mantêm-se abaixo dos 100% (Brodersen, 2004; Cornish et al., 2005; Hilbe et al., 2007; Saliki & Dubovi, 2004; Smith & Grotelueschen, 2004). Optar por uma única técnica, um único teste de diagnóstico, acarreta o risco de falhas de detecção de animais persistentemente infectados, pelo que, e especialmente na presença de um resultado duvidoso, se encontra particularmente indicada a adopção de uma segunda técnica de diagnóstico para “contra-análise”, de forma a rejeitar ou confirmar uma suspeita clínica. Isto é especialmente aplicável na testagem de reprodutores e/ou animais particularmente valiosos (Sandvik, 2004).

Não foram detectados quaisquer casos de infecção persistente, o que se pode dever a uma ou mais razões, entre as quais figuram: baixa prevalência de animais PI nas explorações onde foram efectuadas as colheitas, baixa prevalência de animais PI nas explorações de engorda nacionais, número reduzido de amostras testadas por exploração.

Poderia ainda ser discutida a validade das técnicas utilizadas na detecção de infecções persistentes. A utilidade da imunohistoquímica e do ELISA para captura de antigénio em amostras de pele, para detecção de infecções persistentes, encontra-se documentada na literatura científica, em vários artigos consultados durante a realização deste estudo. Ambas as técnicas apresentam elevados valores de sensibilidade e especificidade, e uma boa correlação com o *gold standard* estabelecido para o diagnóstico das infecções pelo BVDV, o isolamento viral (Brodersen, 2004; Cornish et al., 2005; Grooms & Keilen, 2002; Hilbe et al., 2007; Luzzago et al., 2006).

A literatura disponível sugere elevada robustez de ambos os testes, particularmente em relação a variações dos métodos e condições de colheita das amostras (Grooms & Keilen, 2002; Njaa et al., 2000; Reed, O'Connor, Yoon, & Cooper, 2008).

A validade dos resultados obtidos através do *kit* ELISA utilizado foi assegurada a cada ensaio, de acordo com as especificações do fabricante, assegurando a fiabilidade das leituras obtidas e das conclusões delas retiradas.

Já a validação dos resultados obtidos com recurso à técnica de imunohistoquímica foi efectuada através da utilização de lâminas-teste, como controlo positivo. A marcação imunohistoquímica obtida nestas lâminas funcionou como comprovativo do bom funcionamento da técnica. Igualmente, o facto de ter sido observada marcação imunohistoquímica em algumas das amostras de pele analisadas, com padrões anteriormente descritos na bibliografia consultada, assegura que também neste tecido a técnica se encontra plenamente funcional.

Conclusão

Foram utilizadas duas técnicas diferentes para detecção de antígenos do vírus da Diarreia Bovina Viral em amostras de pele, imunohistoquímica e ELISA para captura de antígeno, com o propósito de detectar animais persistentemente infectados. Apesar de não terem sido detectadas infecções persistentes, ambas as técnicas foram validadas. Doze das cem amostras exibiram padrões de marcação imunohistoquímica compatíveis com infecções agudas, um número relativamente elevado, considerando que a detecção deste tipo de infecção por imunohistoquímica em amostras de pele se encontra descrita como algo raro. Os resultados obtidos reforçam a necessidade de utilização de mais que uma técnica de diagnóstico na detecção de animais persistentemente infectados.

Vários factores podem influenciar a percentagem de animais TI detectados à imunohistoquímica. Apesar de não identificados na amostra testada, a prevalência de animais persistentemente infectados pode ter influenciado o número de infecções agudas detectadas por esta técnica.

Tanto quanto foi possível averiguar, não existem dados a nível nacional sobre a prevalência de animais PI nas explorações de engorda. Na opinião da autora, seria importante obter dados relativos à prevalência nacional de animais PI nas explorações de engorda e, em conjunto com estudos de custo-benefício, considerar a necessidade de implementação de programas de controlo (e/ou erradicação) da Diarreia Bovina Viral nestas explorações (ou mesmo a nível nacional), baseados na testagem dos animais à entrada na exploração e refugo dos animais persistentemente infectados.

Bibliografia

- Agapov, E. V., Murray, C. L., Frolov, I., Qu, L., Myers, T. M., & Rice, C. M. (2004). Uncleaved NS2-3 is required for production of infectious bovine viral diarrhea virus. *J Virol*, 78(5), 2414-2425.
- Al-Haddawi, M., Mitchell, G. B., Clark, M. E., Wood, R. D., & Caswell, J. L. (2007). Impairment of innate immune responses of airway epithelium by infection with bovine viral diarrhea virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 116(3-4), 153-162.
- Apifarma. (2007). *Simposium Veterinário Apifarma 2007-2008*. Lisboa: Apifarma.
- Archambault, D., Beliveau, C., Couture, Y., & Carman, S. (2000). Clinical response and immunomodulation following experimental challenge of calves with type 2 noncytopathogenic bovine viral diarrhea virus. *Vet Res*, 31(2), 215-227.
- Bachofen, C., Braun, U., Hilbe, M., Ehrensperger, F., Stalder, H., & Peterhans, E. (2009). Clinical appearance and pathology of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus of different genetic subgroups. *Vet Microbiol*.
- Bachofen, C., Stalder, H., Braun, U., Hilbe, M., Ehrensperger, F., & Peterhans, E. (2008). Co-existence of genetically and antigenically diverse bovine viral diarrhoea viruses in an endemic situation. *Vet Microbiol*, 131(1-2), 93-102.
- Baigent, S. J., Goodbourn, S., & McCauley, J. W. (2004). Differential activation of interferon regulatory factors-3 and -7 by non-cytopathogenic and cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 100(3-4), 135-144.
- Barros, S. C., Ramos, F., Pauperio, S., Thompson, G., & Fevereiro, M. (2006). Phylogenetic analysis of Portuguese bovine viral diarrhoea virus. *Virus Res*, 118(1-2), 192-195.
- Baule, C., Kulcsar, G., Belak, K., Albert, M., Mittelholzer, C., Soos, T., et al. (2001). Pathogenesis of primary respiratory disease induced by isolates from a new genetic cluster of bovine viral diarrhea virus type I. *J Clin Microbiol*, 39(1), 146-153.
- Becher, P., Thiel, H. J., Collins, M., Brownlie, J., & Orlich, M. (2002). Cellular sequences in pestivirus genomes encoding gamma-aminobutyric acid (A) receptor-associated protein and Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kilodaltons. *J Virol*, 76(24), 13069-13076.
- Belknap, E. B., Collins, J. K., Larsen, R. S., & Conrad, K. P. (2000). Bovine viral diarrhea virus in New World camelids. *J Vet Diagn Invest*, 12(6), 568-570.
- Bielanski, A., Algire, J., Lalonde, A., & Nadin-Davis, S. (2009). Transmission of bovine viral diarrhea virus (BVDV) via in vitro-fertilized embryos to recipients, but not to their offspring. *Theriogenology*, 71(3), 499-508.
- Bielanski, A., Lutze-Wallace, C. L., & Nadin-Davis, S. (2003). Adherence of bovine viral diarrhea virus to bovine oocytes and embryos with a hardened zona pellucida cultured in vitro. *Can J Vet Res*, 67(1), 48-51.
- Bielefeldt-Ohmann, H., Tolnay, A. E., Reisenhauer, C. E., Hansen, T. R., Smirnova, N., & Van Campen, H. (2008). Transplacental infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus types 1b and 2: viral spread and molecular neuropathology. *J Comp Pathol*, 138(2-3), 72-85.

- Birk, A. V., Dubovi, E. J., Cohen-Gould, L., Donis, R., & Szeto, H. H. (2008). Cytoplasmic vacuolization responses to cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Virus Res*, 132(1-2), 76-85.
- Blas-Machado, U., Saliki, J. T., Duffy, J. C., & Caseltine, S. L. (2004). Bovine viral diarrhea virus type 2-induced meningoencephalitis in a heifer. *Vet Pathol*, 41(2), 190-194.
- Bolin, S. R., & Grooms, D. L. (2004). Origination and consequences of bovine viral diarrhea virus diversity. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 20(1), 51-68.
- Booker, C. W., Abutarbush, S. M., Morley, P. S., Guichon, P. T., Wildman, B. K., Jim, G. K., et al. (2008). The effect of bovine viral diarrhea virus infections on health and performance of feedlot cattle. *Can Vet J*, 49(3), 253-260.
- Borel, N., Janett, F., Teankum, K., Zlinszky, K., Iten, C., & Hilbe, M. (2007). Testicular hypoplasia in a bull persistently infected with bovine diarrhoea virus. *J Comp Pathol*, 137(2-3), 169-173.
- Brackenbury, L. S., Carr, B. V., & Charleston, B. (2003). Aspects of the innate and adaptive immune responses to acute infections with BVDV. *Vet Microbiol*, 96(4), 337-344.
- Brewoo, J. N., Haase, C. J., Sharp, P., & Schultz, R. D. (2007). Leukocyte profile of cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 115(3-4), 369-374.
- Brock, K. V. (2004). Strategies for the control and prevention of bovine viral diarrhea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 20(1), 171-180.
- Brock, K. V., Grooms, D. L., Ridpath, J., & Bolin, S. R. (1998). Changes in levels of viremia in cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *J Vet Diagn Invest*, 10(1), 22-26.
- Brodersen, B. W. (2004). Immunohistochemistry used as a screening method for persistent bovine viral diarrhea virus infection. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 20(1), 85-93.
- Bruschke, C. J., Haghparsat, A., Hoek, A., Rutten, V. P., Wentink, G. H., van Rijn, P. A., et al. (1998). The immune response of cattle, persistently infected with noncytopathic BVDV, after superinfection with antigenically semi-homologous cytopathic BVDV. *Vet Immunol Immunopathol*, 62(1), 37-50.
- Campbell, J. R. (2004). Effect of bovine viral diarrhea virus in the feedlot. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 20(1), 39-50.
- Carman, S., Carr, N., DeLay, J., Baxi, M., Deregt, D., & Hazlett, M. (2005). Bovine viral diarrhea virus in alpaca: abortion and persistent infection. *J Vet Diagn Invest*, 17(6), 589-593.
- Carman, S., van Dreumel, T., Ridpath, J., Hazlett, M., Alves, D., Dubovi, E., et al. (1998). Severe acute bovine viral diarrhea in Ontario, 1993-1995. *J Vet Diagn Invest*, 10(1), 27-35.
- Carter, G. R. e. a. (2004). *A Concise review of veterinary virology*. Ithaca NY: International Veterinary Information Service.
- Charleston, B., Brackenbury, L. S., Carr, B. V., Fray, M. D., Hope, J. C., Howard, C. J., et al. (2002). Alpha/beta and gamma interferons are induced by infection with noncytopathic bovine viral diarrhea virus in vivo. *J Virol*, 76(2), 923-927.

- Charleston, B., Fray, M. D., Baigent, S., Carr, B. V., & Morrison, W. I. (2001). Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *J Gen Virol*, 82(Pt 8), 1893-1897.
- Chase, C. C., Elmowalid, G., & Yousif, A. A. (2004). The immune response to bovine viral diarrhoea virus: a constantly changing picture. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 20(1), 95-114.
- Chen, Z., Rijnbrand, R., Jangra, R. K., Devaraj, S. G., Qu, L., Ma, Y., et al. (2007). Ubiquitination and proteasomal degradation of interferon regulatory factor-3 induced by Npro from a cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Virology*, 366(2), 277-292.
- Cherry, B. R., Reeves, M. J., & Smith, G. (1996). Evaluation of bovine viral diarrhoea virus control using a mathematical model of infection dynamics. *Prev Vet Med*, 33, 91-108.
- Childs, T. (1946). X Disease of Cattle - Saskatchewan. *Can J Comp Med Vet Sci*, 10(11), 316-319.
- Choi, K. H., Groarke, J. M., Young, D. C., Kuhn, R. J., Smith, J. L., Pevear, D. C., et al. (2004). The structure of the RNA-dependent RNA polymerase from bovine viral diarrhoea virus establishes the role of GTP in de novo initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(13), 4425-4430.
- Cleveland, S. M., Salman, M. D., & Van Campen, H. (2006). Assessment of a bovine viral diarrhoea virus antigen capture ELISA and a microtiter virus isolation ELISA using pooled ear notch and serum samples. *J Vet Diagn Invest*, 18(4), 395-398.
- Collen, T., Douglas, A. J., Paton, D. J., Zhang, G., & Morrison, W. I. (2000). Single amino acid differences are sufficient for CD4(+) T-cell recognition of a heterologous virus by cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *Virology*, 276(1), 70-82.
- Confer, A. W., Fulton, R. W., Step, D. L., Johnson, B. J., & Ridpath, J. F. (2005). Viral antigen distribution in the respiratory tract of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus subtype 2a. *Vet Pathol*, 42(2), 192-199.
- Cornish, T. E., van Olphen, A. L., Cavender, J. L., Edwards, J. M., Jaeger, P. T., Vieyra, L. L., et al. (2005). Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Vet Diagn Invest*, 17(2), 110-117.
- Couvreux, B., Letellier, C., Collard, A., Quenon, P., Dehan, P., Hamers, C., et al. (2002). Genetic and antigenic variability in bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Belgium. *Virus Res*, 85(1), 17-28.
- Craig, M. I., Venzano, A., Konig, G., Morris, W. E., Jimenez, L., Julia, S., et al. (2008). Detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) nucleic acid and antigen in different organs of water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Res Vet Sci*, 85(1), 194-196.
- DuBois, W. R., Cooper, V. L., Duffy, J. C., Ball, R. L., & Starr Jr., B. D. (2000). A Preliminary Evaluation of the Effect of Vaccination with Modified Live Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) on Detection of BVDV Antigen in Skin Biopsies Using Immunohistochemical Methods. *The Bovine Practitioner*, 34(2), 98-100.
- Duong, M. C., Alenius, S., Huong, L. T., & Bjorkman, C. (2008). Prevalence of *Neospora caninum* and bovine viral diarrhoea virus in dairy cows in Southern Vietnam. *Vet J*, 175(3), 390-394.

- Endsley, J. J., Roth, J. A., Ridpath, J., & Neill, J. (2003). Maternal antibody blocks humoral but not T cell responses to BVDV. *Biologicals*, 31(2), 123-125.
- Fevereiro, M. (2008). Aspectos gerais do vírus da Diarreia Viral dos Bovinos e Doença das Mucosas (BVDV/MD). In Pfizer Saúde Animal, *Proceedings do Symposium de Lançamento da vacina Pregsure® BVD*, Lisboa, 21 de Junho de 2008. 3-5.
- Fray, M. D., Mann, G. E., Bleach, E. C., Knight, P. G., Clarke, M. C., & Charleston, B. (2002). Modulation of sex hormone secretion in cows by acute infection with bovine viral diarrhoea virus. *Reproduction*, 123(2), 281-289.
- Fredriksen, B., Press, C. M., Loken, T., & Odegaard, S. A. (1999). Distribution of viral antigen in uterus, placenta and foetus of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Microbiol*, 64(2-3), 109-122.
- Fritzemeier, J., Haas, L., Liebler, E., Moennig, V., & Greiser-Wilke, I. (1997). The development of early vs. late onset mucosal disease is a consequence of two different pathogenic mechanisms. *Arch Virol*, 142(7), 1335-1350.
- Fulton, R. W., Briggs, R. E., Payton, M. E., Confer, A. W., Saliki, J. T., Ridpath, J. F., et al. (2004). Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1a, BVDV1b, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus bovine respiratory syncytial virus, Mannheimia haemolytica and Pasteurella multocida in beef calves, antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination. *Vaccine*, 22(5-6), 643-649.
- Fulton, R. W., Purdy, C. W., Confer, A. W., Saliki, J. T., Loan, R. W., Briggs, R. E., et al. (2000). Bovine viral diarrhea viral infections in feeder calves with respiratory disease: interactions with Pasteurella spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Can J Vet Res*, 64(3), 151-159.
- Fulton, R. W., Saliki, J. T., Burge, L. J., & Payton, M. E. (2003). Humoral immune response and assessment of vaccine virus shedding in calves receiving modified live virus vaccines containing bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhoea virus 1a. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 50(1), 31-37.
- Galav, V., Mishra, N., Dubey, R., Rajukumar, K., Pitale, S. S., Shrivastav, A. B., et al. (2007). Pathogenicity of an Indian isolate of bovine viral diarrhea virus 1b in experimentally infected calves. *Res Vet Sci*, 83(3), 364-368.
- Gard, J. A., Givens, M. D., Marley, M. S., Galik, P. K., Riddell, K. P., Stringfellow, D. A., et al. (2009). Bovine viral diarrhea virus (BVDV) associated with single in vivo-derived and in vitro-produced preimplantation bovine embryos following artificial exposure. *Theriogenology*, 71(8), 1238-1244.
- Gard, J. A., Givens, M. D., & Stringfellow, D. A. (2007). Bovine viral diarrhea virus (BVDV): epidemiologic concerns relative to semen and embryos. *Theriogenology*, 68(3), 434-442.
- Garoussi, M. T., Haghparsat, A., & Estajee, H. (2008). Prevalence of bovine viral diarrhoea virus antibodies in bulk tank milk of industrial dairy cattle herds in suburb of Mashhad-Iran. *Prev Vet Med*, 84(1-2), 171-176.
- Giangaspero, M., Harasawa, R., Weber, L., & Belloli, A. (2008). Genoepidemiological evaluation of Bovine viral diarrhea virus 2 species based on secondary structures in the 5' untranslated region. *J Vet Med Sci*, 70(6), 571-580.

- Givens, M. D., Riddell, K. P., Edmondson, M. A., Walz, P. H., Gard, J. A., Zhang, Y., et al. (2009). Epidemiology of prolonged testicular infections with bovine viral diarrhea virus. *Vet Microbiol*.
- Givens, M. D., Riddell, K. P., Zhang, Y., Galik, P., Walz, P. H., Brodersen, B. W., et al. (2009). Safety and efficacy of vaccination of seronegative bulls with modified-live, cytopathic bovine viral diarrhea viruses. *Theriogenology*, 71(6), 975-983.
- Givens, M. D., & Waldrop, J. G. (2004). Bovine viral diarrhea virus in embryo and semen production systems. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 20(1), 21-38.
- Glew, E. J., Carr, B. V., Brackenbury, L. S., Hope, J. C., Charleston, B., & Howard, C. J. (2003). Differential effects of bovine viral diarrhoea virus on monocytes and dendritic cells. *J Gen Virol*, 84(Pt 7), 1771-1780.
- Goens, S. D. (2002). The evolution of bovine viral diarrhea: a review. *Can Vet J*, 43(12), 946-954.
- Grom, J., & Barlic-Maganja, D. (1999). Bovine viral diarrhoea (BVD) infections--control and eradication programme in breeding herds in Slovenia. *Vet Microbiol*, 64(2-3), 259-264.
- Grooms, D. L. (2004). Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 20(1), 5-19.
- Grooms, D. L. (2006). Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. *Theriogenology*, 66(3), 624-628.
- Grooms, D. L. (2008). Role of bovine viral diarrhea virus in the bovine respiratory disease complex. In CVC Central, *Proceedings da Central Veterinary Conference*, Kansas, 1 de Agosto de 2008.
- Grooms, D. L., Brock, K. V., & Ward, L. A. (1998). Detection of bovine viral diarrhea virus in the ovaries of cattle acutely infected with bovine viral diarrhea virus. *J Vet Diagn Invest*, 10(2), 125-129.
- Grooms, D. L., & Keilen, E. D. (2002). Screening of neonatal calves for persistent infection with bovine viral diarrhea virus by immunohistochemistry on skin biopsy samples. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9(4), 898-900.
- Gu, B., Liu, C., Lin-Goerke, J., Maley, D. R., Gutshall, L. L., Feltenberger, C. A., et al. (2000). The RNA helicase and nucleotide triphosphatase activities of the bovine viral diarrhea virus NS3 protein are essential for viral replication. *J Virol*, 74(4), 1794-1800.
- Guarino, H., Nunez, A., Repiso, M. V., Gil, A., & Dargatz, D. A. (2008). Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhea virus in beef cattle in Uruguay. *Prev Vet Med*, 85(1-2), 34-40.
- Gunn, H. M. (1993). Role of fomites and flies in the transmission of bovine viral diarrhoea virus. *Vet Rec*, 132(23), 584-585.
- Haines, D. M., Clark, E. G., & Dubovi, E. J. (1992). Monoclonal antibody-based immunohistochemical detection of bovine viral diarrhea virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Vet Pathol*, 29(1), 27-32.
- Harkness, J. W., & Van Der Lugt, J. J. (Eds.). (1994). *Bovine viral diarrhoea and mucosal disease*. In COETZER, J. A. W.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. *Infectious Diseases of Livestock*. Cape Town: Oxford University Press.

- Hilbe, M., Stalder, H., Peterhans, E., Haessig, M., Nussbaumer, M., Egli, C., et al. (2007). Comparison of five diagnostic methods for detecting bovine viral diarrhoea virus infection in calves. *J Vet Diagn Invest*, 19(1), 28-34.
- Hornberg, A., Fernandez, S. R., Vogl, C., Vilcek, S., Matt, M., Fink, M., et al. (2009). Genetic diversity of pestivirus isolates in cattle from Western Austria. *Vet Microbiol*, 135(3-4), 205-213.
- Houe, H. (1999). Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol*, 64(2-3), 89-107.
- Innocent, G., Morrison, I., Brownlie, J., & Gettinby, G. (1997). A computer simulation of the transmission dynamics and the effects of duration of immunity and survival of persistently infected animals on the spread of bovine viral diarrhoea virus in dairy cattle. *Epidemiol Infect*, 119(1), 91-100.
- Jones, L. R., Zandomeni, R., & Weber, E. L. (2001). Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus isolates from Argentina. *Vet Microbiol*, 81(4), 367-375.
- Jubb, K. V. F., & Kennedy, P. C. (1963). *Pathology of domestic animals* (Vol. 2). New York: Academic Press.
- Kadir, Y., Christine, F., Barbara, B. W., Zeki, Y., Feray, A., Aykut, O., et al. (2008). Genetic heterogeneity of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates from Turkey: identification of a new subgroup in BVDV-1. *Vet Microbiol*, 130(3-4), 258-267.
- Kampa, J., Alenius, S., Emanuelson, U., Chanlun, A., & Aiumlamai, S. (2008). Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in dairy herds: Self clearance and the detection of seroconversions against a new atypical pestivirus. *Vet J*.
- Kelling, C. L. (2004). Evolution of bovine viral diarrhoea virus vaccines. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 20(1), 115-129.
- Kim, S. G., Anderson, R. R., Yu, J. Z., Zylich, N. C., Kinde, H., Carman, S., et al. (2009). Genotyping and phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea virus isolates from BVDV infected alpacas in North America. *Vet Microbiol*, 136(3-4), 209-216.
- Kocan, A. A., Franzmann, A. W., Waldrup, K. A., & Kubat, G. J. (1986). Serologic studies of select infectious diseases of moose (*Alces alces* L.) from Alaska. *J Wildl Dis*, 22(3), 418-420.
- Krey, T., Himmelreich, A., Heimann, M., Menge, C., Thiel, H. J., Maurer, K., et al. (2006). Function of bovine CD46 as a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus is determined by complement control protein 1. *J Virol*, 80(8), 3912-3922.
- Krey, T., Moussay, E., Thiel, H. J., & Rumenapf, T. (2006). Role of the low-density lipoprotein receptor in entry of bovine viral diarrhoea virus. *J Virol*, 80(21), 10862-10867.
- Krey, T., Thiel, H. J., & Rumenapf, T. (2005). Acid-resistant bovine pestivirus requires activation for pH-triggered fusion during entry. *J Virol*, 79(7), 4191-4200.
- Lackner, T., Muller, A., Konig, M., Thiel, H. J., & Tautz, N. (2005). Persistence of bovine viral diarrhoea virus is determined by a cellular cofactor of a viral autoprotease. *J Virol*, 79(15), 9746-9755.

- Larson, R. L., Brodersen, B. W., Grotelueschen, D. M., Hunsaker, B. D., Burdett, W., Brock, K. V., et al. (2005). Considerations for Bovine Viral Diarrhea (BVD) Testing. *The Bovine Practitioner*, 39(2), 96-100.
- Larson, R. L., Grotelueschen, D. M., Brock, K. V., Hunsaker, B. D., Smith, R. A., Sprowls, R. W., et al. (2004). Bovine Viral Diarrhea (BVD): Review for Beef Cattle Veterinarians. *The Bovine Practitioner*, 38(1), 93-102.
- Lecot, S., Belouzard, S., Dubuisson, J., & Rouille, Y. (2005). Bovine viral diarrhea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*, 79(16), 10826-10829.
- Lee, S. R., Nanduri, B., Pharr, G. T., Stokes, J. V., & Pinchuk, L. M. (2009). Bovine viral diarrhea virus infection affects the expression of proteins related to professional antigen presentation in bovine monocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1794(1), 14-22.
- Liebler-Tenorio, E. M., Lanwehr, A., Greiser-Wilke, I., Loehr, B. I., & Pohlenz, J. (2000). Comparative investigation of tissue alterations and distribution of BVD-viral antigen in cattle with early onset versus late onset mucosal disease. *Vet Microbiol*, 77(1-2), 163-174.
- Liebler-Tenorio, E. M., Ridpath, J. E., & Neill, J. D. (2004). Distribution of viral antigen and tissue lesions in persistent and acute infection with the homologous strain of noncytopathic bovine viral diarrhea virus. *J Vet Diagn Invest*, 16(5), 388-396.
- Lindberg, A., & Houe, H. (2005). Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhea virus (BVDV) of relevance to control. *Prev Vet Med*, 72(1-2), 55-73; discussion 215-219.
- Loehr, B. I., Frey, H. R., Moennig, V., & Greiser-Wilke, I. (1998). Experimental induction of mucosal disease: consequences of superinfection of persistently infected cattle with different strains of cytopathogenic bovine viral diarrhea virus. *Arch Virol*, 143(4), 667-679.
- Luzzago, C., Frigerio, M., Tolari, F., Mazzei, M., Salvadori, C., Del Piero, F., et al. (2006). Indirect immunohistochemistry on skin biopsy for the detection of persistently infected cattle with bovine viral diarrhoea virus in Italian dairy herds. *New Microbiol*, 29(2), 127-131.
- Marley, M. S., Tabor, J. M., Givens, M. D., Kaproth, M., Riddell, K. P., Galik, P. K., et al. (2009). Bovine viral diarrhea virus is inactivated when whole milk from persistently infected cows is heated to prepare semen extender. *Vet Microbiol*, 134(3-4), 249-253.
- Matzener, P., Magkouras, I., Rumenapf, T., Peterhans, E., & Schweizer, M. (2009). The viral RNase E(rns) prevents IFN type-I triggering by pestiviral single- and double-stranded RNAs. *Virus Res*, 140(1-2), 15-23.
- Maurer, K., Krey, T., Moennig, V., Thiel, H. J., & Rumenapf, T. (2004). CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus. *J Virol*, 78(4), 1792-1799.
- McGavin, M. D., & Zachary, J. F. (2007). *Pathologic basis of veterinary disease* (4th ed.). St. Louis, Mo.: Mosby Elsevier.
- McGowan, M. R., Kafi, M., Kirkland, P. D., Kelly, R., Bielefeldt-Ohmann, H., Occhio, M. D., et al. (2003). Studies of the pathogenesis of bovine pestivirus-induced ovarian dysfunction in superovulated dairy cattle. *Theriogenology*, 59(3-4), 1051-1066.

- Mishra, N., Vilcek, S., Rajukumar, K., Dubey, R., Tiwari, A., Galav, V., et al. (2008). Identification of bovine viral diarrhea virus type 1 in yaks (*Bos poecephagus grunniens*) in the Himalayan region. *Res Vet Sci*, 84(3), 507-510.
- Mockeliuniene, V., Salomskas, A., Mockeliunas, R., & Petkevicius, S. (2004). Prevalence and epidemiological features of bovine viral diarrhoea virus infection in Lithuania. *Vet Microbiol*, 99(1), 51-57.
- Moen, A., Sol, J., & Sampimon, O. (2005). Indication of transmission of BVDV in the absence of persistently infected (PI) animals. *Prev Vet Med*, 72(1-2), 93-98; discussion 215-219.
- Montgomery, D. L. (2007). Distribution and cellular heterogeneity of bovine viral diarrhea viral antigen expression in the brain of persistently infected calves: a new perspective. *Vet Pathol*, 44(5), 643-654.
- Muller-Doblies, D., Arquint, A., Schaller, P., Heegaard, P. M., Hilbe, M., Albin, S., et al. (2004). Innate immune responses of calves during transient infection with a noncytopathic strain of bovine viral diarrhea virus. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11(2), 302-312.
- Murphy, F. A. (1999). *Veterinary virology* (3rd ed.). San Diego: Academic Press.
- Murray, C. L., Marcotrigiano, J., & Rice, C. M. (2008). Bovine viral diarrhea virus core is an intrinsically disordered protein that binds RNA. *J Virol*, 82(3), 1294-1304.
- Niskanen, R., & Lindberg, A. (2003). Transmission of bovine viral diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air, and from contaminated pens. *Vet J*, 165(2), 125-130.
- Niskanen, R., Lindberg, A., & Traven, M. (2002). Failure to spread bovine virus diarrhoea virus infection from primarily infected calves despite concurrent infection with bovine coronavirus. *Vet J*, 163(3), 251-259.
- Njaa, B. L., Clark, E. G., Janzen, E., Ellis, J. A., & Haines, D. M. (2000). Diagnosis of persistent bovine viral diarrhea virus infection by immunohistochemical staining of formalin-fixed skin biopsy specimens. *J Vet Diagn Invest*, 12(5), 393-399.
- Nobiron, I., Thompson, I., Brownlie, J., & Collins, M. E. (2003). DNA vaccination against bovine viral diarrhoea virus induces humoral and cellular responses in cattle with evidence for protection against viral challenge. *Vaccine*, 21(17-18), 2082-2092.
- O'Connor, A., Martin, S. W., Nagy, E., Menzies, P., & Harland, R. (2001). The relationship between the occurrence of undifferentiated bovine respiratory disease and titer changes to bovine coronavirus and bovine viral diarrhea virus in 3 Ontario feedlots. *Can J Vet Res*, 65(3), 137-142.
- Oem, J. K., Hyun, B. H., Cha, S. H., Lee, K. K., Kim, S. H., Kim, H. R., et al. (2009). Phylogenetic analysis and characterization of Korean bovine viral diarrhea viruses. *Vet Microbiol*, 139(3-4), 356-360.
- OIE, O. I. d. E. (2008). *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. Paris: Office International des Epizooties.
- Pankraz, A., Thiel, H. J., & Becher, P. (2005). Essential and nonessential elements in the 3' nontranslated region of Bovine viral diarrhea virus. *J Virol*, 79(14), 9119-9127.
- Passler, T., Walz, P. H., Ditchkoff, S. S., Brock, K. V., Deyoung, R. W., Foley, A. M., et al. (2009). Cohabitation of pregnant white-tailed deer and cattle persistently infected with

- Bovine viral diarrhea virus results in persistently infected fawns. *Vet Microbiol*, 134(3-4), 362-367.
- Pedreira, M., Sanchez-Cordon, P. J., Romero-Treveljo, J. L., Risalde, M. A., Greiser-Wilke, I., Nunez, A., et al. (2009). Morphological changes and virus distribution in the ileum of colostrum-deprived calves inoculated with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus genotype-1. *J Comp Pathol*, 141(1), 52-62.
- Peterhans, E., Jungi, T. W., & Schweizer, M. (2003). BVDV and innate immunity. *Biologicals*, 31(2), 107-112.
- Peterhans, E., & Schweizer, M. (2009). Pestiviruses: How to outmaneuver your hosts. *Vet Microbiol*.
- Pinchuk, G. V., Lee, S. R., Nanduri, B., Honsinger, K. L., Stokes, J. V., & Pinchuk, L. M. (2008). Bovine viral diarrhea viruses differentially alter the expression of the protein kinases and related proteins affecting the development of infection and anti-viral mechanisms in bovine monocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1784(9), 1234-1247.
- Potgieter, L. N. D. (2004). *Bovine viral diarrhoea and mucosal disease*. In COETZER, J. A. W.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. *Infectious Diseases of Livestock* (2 ed. Vol. 2). Cape Town: Oxford University Press.
- Qu, L., McMullan, L. K., & Rice, C. M. (2001). Isolation and characterization of noncytopathic pestivirus mutants reveals a role for nonstructural protein NS4B in viral cytopathogenicity. *J Virol*, 75(22), 10651-10662.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W., & Constable, P. D. (2007). *Veterinary Medicine - A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats* (10^a ed.). Filadélfia: Saunders Elsevier.
- Radostits, O. M., & Littlejohns, I. R. (1988). New Concepts in the Pathogenesis, Diagnosis and Control of Diseases Caused by the Bovine Viral Diarrhea Virus. *Can Vet J*, 29(6), 513-528.
- Reed, M. C., O'Connor, A. M., Yoon, K. J., & Cooper, V. L. (2008). Assessing the effect of sample handling on the performance of a commercial bovine viral diarrhea virus antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Vet Diagn Invest*, 20(1), 124-126.
- Rodning, S. P., Marley, M. S., Zhang, Y., Eason, A. B., Nunley, C. L., Walz, P. H., et al. (2010). Comparison of three commercial vaccines for preventing persistent infection with bovine viral diarrhea virus. *Theriogenology*.
- Saliki, J. T., & Dubovi, E. J. (2004). Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 20(1), 69-83.
- Sandvik, T. (1999). Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Vet Microbiol*, 64(2-3), 123-134.
- Sandvik, T. (2004). Progress of control and prevention programs for bovine viral diarrhea virus in Europe. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 20(1), 151-169.
- Sausker, E. A., & Dyer, N. W. (2002). Seroprevalence of OHV-2, BVDV, BHV-1, and BRSV in ranch-raised bison (*Bison bison*). *J Vet Diagn Invest*, 14(1), 68-70.

- Schweizer, M., Matzener, P., Pfaffen, G., Stalder, H., & Peterhans, E. (2006). "Self" and "nonself" manipulation of interferon defense during persistent infection: bovine viral diarrhea virus resists alpha/beta interferon without blocking antiviral activity against unrelated viruses replicating in its host cells. *J Virol*, 80(14), 6926-6935.
- Seki, Y., Seimiya, Y. M., Motokawa, M., Yaegashi, G., Nagai, M., & Hayashi, M. (2008). Application of restriction fragment length polymorphism analysis to simple and rapid genotyping of bovine viral diarrhea virus strains isolated in Japan. *J Vet Med Sci*, 70(4), 393-395.
- Shahriar, F. M., Clark, E. G., Janzen, E., West, K., & Wobeser, G. (2002). Coinfection with bovine viral diarrhea virus and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia. *Can Vet J*, 43(11), 863-868.
- Shin, T., & Acland, H. (2001). Tissue distribution of bovine viral diarrhea virus antigens in persistently infected cattle. *J Vet Sci*, 2(2), 81-84.
- Singh, E. L., Eaglesome, M. D., Thomas, F. C., Papp-Vid, G., & Hare, W. C. (1982). Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. I. The in vitro exposure of preimplantation bovine embryos to akabane, bluetongue and bovine viral diarrhea viruses. *Theriogenology*, 17(4), 437-444.
- Smirnova, N. P., Bielefeldt-Ohmann, H., Van Campen, H., Austin, K. J., Han, H., Montgomery, D. L., et al. (2008). Acute non-cytopathic bovine viral diarrhea virus infection induces pronounced type I interferon response in pregnant cows and fetuses. *Virus Res*, 132(1-2), 49-58.
- Smith, B. P. (2002). *Large animal internal medicine* (3rd ed.). St. Louis, Mo. ; London: Mosby.
- Smith, D. R. (2002). Epidemiologic tools for biosecurity and biocontainment. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 18(1), 157-175.
- Smith, D. R., & Grotelueschen, D. M. (2004). Biosecurity and biocontainment of bovine viral diarrhea virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 20(1), 131-149.
- Stauber, E. H., Autenrieth, R., Markham, O. D., & Whitbeck, V. (1980). A seroepidemiologic survey of three pronghorn (*Antilocapra americana*) populations in southeastern Idaho, 1975-1977. *J Wildl Dis*, 16(1), 109-115.
- Sun, J. H., Lemm, J. A., O'Boyle, D. R., 2nd, Racela, J., Colonno, R., & Gao, M. (2003). Specific inhibition of bovine viral diarrhea virus replicase. *J Virol*, 77(12), 6753-6760.
- Tizard, I. R. (2004). *Veterinary immunology : an introduction* (7th ed.). Philadelphia: Saunders.
- Toth, R. L., Nettleton, P. F., & McCrae, M. A. (1999). Expression of the E2 envelope glycoprotein of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) elicits virus-type specific neutralising antibodies. *Vet Microbiol*, 65(2), 87-101.
- Tscherne, D. M., Evans, M. J., Macdonald, M. R., & Rice, C. M. (2008). Transdominant inhibition of bovine viral diarrhea virus entry. *J Virol*, 82(5), 2427-2436.
- Uttenthal, A., Grondahl, C., Hoyer, M. J., Houe, H., van Maanen, C., Rasmussen, T. B., et al. (2005). Persistent BVDV infection in mousedeer infects calves. Do we know the reservoirs for BVDV? *Prev Vet Med*, 72(1-2), 87-91; discussion 215-219.
- Uttenthal, A., Hoyer, M. J., Grondahl, C., Houe, H., van Maanen, C., Rasmussen, T. B., et al. (2006). Vertical transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in mousedeer (*Tragulus javanicus*) and spread to domestic cattle. *Arch Virol*, 151(12), 2377-2387.

- Van Campen, H., Ridpath, J., Williams, E., Cavender, J., Edwards, J., Smith, S., et al. (2001). Isolation of bovine viral diarrhea virus from a free-ranging mule deer in Wyoming. *J Wildl Dis*, 37(2), 306-311.
- Vilcek, S., Durkovic, B., Kolesarova, M., & Paton, D. J. (2005). Genetic diversity of BVDV: consequences for classification and molecular epidemiology. *Prev Vet Med*, 72(1-2), 31-35; discussion 215-219.
- Vilcek, S., & Nettleton, P. F. (2006). Pestiviruses in wild animals. *Vet Microbiol*, 116(1-3), 1-12.
- Vilcek, S., Ridpath, J. F., Van Campen, H., Cavender, J. L., & Warg, J. (2005). Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. *Virus Res*, 108(1-2), 187-193.
- Walz, P. H., Bell, T. G., Grooms, D. L., Kaiser, L., Maes, R. K., & Baker, J. C. (2001). Platelet aggregation responses and virus isolation from platelets in calves experimentally infected with type I or type II bovine viral diarrhea virus. *Can J Vet Res*, 65(4), 241-247.
- Welsh, M. D., Adair, B. M., & Foster, J. C. (1995). Effect of BVD virus infection on alveolar macrophage functions. *Vet Immunol Immunopathol*, 46(3-4), 195-210.
- Williams, E. S., & Barker, I. K. (2001). *Infectious diseases of wild mammals* (3rd ed ed.). London: Manson Publishing.
- Wood, R. D., Goens, S. D., Carman, P. S., Deregt, D., Jefferson, B., & Jacobs, R. M. (2004). Effect on hematopoietic tissue of experimental infection of calves with noncytopathic type 2 bovine viral diarrhea virus. *Can J Vet Res*, 68(1), 42-48.
- Xue, F., Zhu, Y.-M., Li, J., Zhu, L.-C., Ren, X.-G., Feng, J.-K., et al. (2008). Genotyping of bovine viral diarrhea viruses from cattle in China between 2005 and 2008. *Vet Microbiol*.
- Yousif, A. A., Braun, L. J., Saber, M. S., Aboelleil, T., & Chase, C. C. L. (2004). Cytopathic genotype 2 bovine viral diarrhea virus in dromedary camels. *Arab J Biotech*, 7(1), 123-140.

Anexo I. Países em que se encontram documentadas infecções pelo vírus da Diarreia Bovina Viral.

País	Genótipo	Referência
Alemanha	BVDV-2	(Barros, Ramos, Pauperio, Thompson, & Fevereiro, 2006)
Argentina	BVDV-1a	(Barros et al., 2006; Jones, Zandomeni, & Weber, 2001)
Argentina	BVDV-1b	(Jones et al., 2001)
Argentina	BVDV-2	(Barros et al., 2006; Jones et al., 2001)
Argentina	BVDV-2b	(Barros et al., 2006)
Áustria	BVDV-1a, 1e, 1h, 1k	(Hornberg et al., 2009)
Áustria	BVDV-1b, 1d, 1f, 1g	(Barros et al., 2006; Hornberg et al., 2009)
Áustria	BVDV-2a	(Giangaspero, Harasawa, Weber, & Belloli, 2008; Hornberg et al., 2009)
Bélgica	BVDV-1a, 1b	(Couvreur et al., 2002)
Bélgica	BVDV-2a	(Giangaspero et al., 2008)
Brasil	BVDV-2b	(Barros et al., 2006)
Canadá	BVDV-2	(Barros et al., 2006)
China	BVDV-1b, 1f, 1m	(Xue et al., 2008)
Coreia	BVDV-1a, 1b, 1n, 2a	(Oem et al., 2009)
Dinamarca	Não especificado	(Radostits et al., 2007)
Eslováquia	BVDV-2a	(Giangaspero et al., 2008)
Eslovênia	Não especificado	(Grom & Barlic-Maganja, 1999)
EUA	BVDV-1a, 2	(Barros et al., 2006)
EUA	BVDV-2a	(Barros et al., 2006; Giangaspero et al., 2008)
França	BVDV-2a	(Giangaspero et al., 2008)
Índia	BVDV-1b	(Galav et al., 2007)
Inglaterra	BVDV-1a, 1b, 1i	(Barros et al., 2006)
Irão	Não especificado	(Garoussi, Haghparsat, & Estajee, 2008)
Itália	BVDV-1e, 2	(Barros et al., 2006)
Itália	BVDV-2a	(Giangaspero et al., 2008)
Japão	BVDV-1a	(Barros et al., 2006)
Japão	BVDV-1b, 1c, 1d, 1e, 1f	(Seki et al., 2008)
Japão	BVDV-2a	(Barros et al., 2006; Giangaspero et al., 2008)
Japão	BVDV-So	(Seki et al., 2008)
Lituânia	Não especificado	(Mockeliuniene et al., 2004)
Moçambique	BVDV-1c	(Barros et al., 2006)
Moçambique	BVDV-1d	(Barros et al., 2006)
Namíbia	Não especificado	(Potgieter, 2004)
Noruega	Não especificado	(Radostits et al., 2007)
Nova Zelândia	BVDV-2a	(Barros et al., 2006; Giangaspero et al., 2008)
Portugal	BVDV-1a, 1b, 1d, 1e, 2a, 2b	(Barros et al., 2006)
Reino Unido	BVDV-2a	(Giangaspero et al., 2008)
Suécia	Não especificado	(Radostits et al., 2007)
Suíça	BVDV-1a, 1b, 1e, 1h, 1k	(Bachofen et al., 2008)
Tailândia	Não especificado	(Kampa, Alenius, Emanuelson, Chanlun, & Aiumlamai, 2008)
Turquia	BVDV-1a, 1b, 1d, 1f, 1h, 1i, 2b	(Kadir et al., 2008)
Uruguai	Não especificado	(Guarino, Nunez, Repiso, Gil, & Dargatz, 2008)
Vietname	Não especificado	(Duong, Alenius, Huong, & Bjorkman, 2008)
Zimbabué	Não especificado	(Potgieter, 2004)

Anexo II. Tecidos e tipos celulares em que é possível identificar a presença do BVDV.

Tecido	Tipos celulares positivos para presença BVDV	Referência
Adrenal	Macrófagos intersticiais (raro)	(Bielefeldt-Ohmann et al., 2008)
Baço	Megacariócitos, células mononucleares e mesenquimatosas	(Bielefeldt-Ohmann et al., 2008)
Brônquios/bronquíolos	Células do epitélio mucociliar, cartilagem, células musculares lisas	(Confer et al., 2005)
Cavidade nasal	Células do epitélio mucociliar, cartilagem	(Confer et al., 2005; Liebler-Tenorio et al., 2004)
Cérebro	Neurónios, células das camadas germinais periventriculares, astrócitos, oligodendrócitos, células macrófago-like infiltrando as leptomeninges, ventrículos e neurópilo, pericitos	(Bielefeldt-Ohmann et al., 2008)
Coração	Macrófagos intersticiais, pericitos e músculo liso dos vasos	(Bielefeldt-Ohmann et al., 2008)
Esófago	Células epiteliais	(Haines et al., 1992; Liebler-Tenorio et al., 2004)
Fígado	Células de Kupffer, megacariócitos, células mononucleares	(Bielefeldt-Ohmann et al., 2008)
Intestino (cólon/recto)	Tipo celular não indicado	(Liebler-Tenorio et al., 2004)
Intestino (duodeno)	Tipo celular não indicado	(Liebler-Tenorio et al., 2004)
Intestino (jejuno/íleo)	Células epiteliais, células mononucleares da <i>lamina propria</i> e submucosa, células mononucleares perifoliculares das placas de Peyer	(Bielefeldt-Ohmann et al., 2008; Haines et al., 1992)
Linfonodos	Macrófagos, células dendríticas e células dendríticas foliculares	(Bielefeldt-Ohmann et al., 2008)
Mama	Células epiteliais glandulares	(Shin & Acland, 2001)
Medula óssea	Tipo celular não indicado	(Liebler-Tenorio et al., 2004)
Mucosa oral	Tipo celular não indicado	(Liebler-Tenorio et al., 2004)
Músculo esquelético	Sem detecção de antígeno viral	(Bielefeldt-Ohmann et al., 2008)
Nasofaringe	Células do epitélio mucociliar	(Confer et al., 2005)
Olho	Neurónios, epitélio da retina, pericitos	(Bielefeldt-Ohmann et al., 2008)
Omaso/abomaso	Células epiteliais, células mononucleares da <i>lamina propria</i> , células musculares lisas	(Bielefeldt-Ohmann et al., 2008)
Ovário	Células mononucleares intersticiais (raro)	(Bielefeldt-Ohmann et al., 2008)
Pâncreas	Macrófagos intersticiais, células dos ilhéus de Langerhans	(Bielefeldt-Ohmann et al., 2008)

Anexo II. Tecidos e tipos celulares em que é possível identificar a presença do BVDV (continuação).

Tecido	Tipos celulares positivos para presença BVDV	Referência
Parótida	Tipo celular não indicado	(Liebler-Tenorio et al., 2004)
Pele	Queratinócitos, células basais das glândulas apócrinas e sebáceas, macrófagos da derme, epitélio dos folículos pilosos	(Bielefeldt-Ohmann et al., 2008; Njaa et al., 2000)
Pulmões	Epitélio respiratório, macrófagos alveolares e intersticiais, células dendríticas	(Bielefeldt-Ohmann et al., 2008)
Rim	Células do epitélio tubular	(Bielefeldt-Ohmann et al., 2008)
Rúmen	Tipo celular não indicado	(Liebler-Tenorio et al., 2004)
Testículos	Células de Sertoli, espermatogônias, células dos vasos sanguíneos	(Borel et al., 2007)
Epidídimo	Células epiteliais do ducto epididimal	(Borel et al., 2007)
Timo	Macrófagos do córtex e interstício	(Bielefeldt-Ohmann et al., 2008)
Próstata/vesículas seminais/glândulas bulbouretrais	Células epiteliais, células dos vasos sanguíneos	(Borel et al., 2007)
Tiróide	Células do epitélio glandular, macrófagos intersticiais	(Bielefeldt-Ohmann et al., 2008)
Traqueia	Células do epitélio mucociliar, cartilagem	(Confer et al., 2005; Liebler-Tenorio et al., 2004)
Útero	Células musculares lisas, epitélio endometrial, células dos vasos	(Fredriksen et al., 1999; Shin & Acland, 2001)
Vestíbulo nasal	Células do epitélio mucociliar	(Confer et al., 2005)

Anexo III. Processamento histológico e coloração de rotina.

Protocolo de processamento automático de tecidos

(Leica TP 1020)

Procedimentos

1	Formol a 10% à temperatura ambiente	60 min
2	Álcool a 70° à temperatura ambiente	60 min
3	Álcool a 95° à temperatura ambiente	90 min
4	Álcool a 95° à temperatura ambiente	90 min
5	Álcool a 100° à temperatura ambiente	60 min
6	Álcool a 100° à temperatura ambiente	90 min
7	Álcool a 100° à temperatura ambiente	90 min
8	Xilol à temperatura ambiente	60 min
9	Xilol à temperatura ambiente	60 min
10	Xilol à temperatura ambiente	60 min
11	Parafina a 68°C	120 min
12	Parafina a 68°C	120 min
13	Inclusão do fragmento em bloco de parafina (ponto de fusão a 56-58°C)	

Anexo III. Processamento histológico e coloração de rotina (continuação).

Protocolo de coloração pela Hematoxilina-Eosina

Reagentes

Hematoxilina de Gill 2 – (sigma-GHS 280)

Eosina-Floxina – (sigma-HT110-3)

Procedimentos

1	Xilol	15 min
2	Xilol	5 min
3	Álcool a 100°	1 min
4	Álcool a 95°	1 min
5	Álcool a 70°	1 min
6	Hidratação em água destilada	5min
7	Hematoxilina de Gill 2	30 s
8	Lavagem em água destilada	2 min
9	Lavagem em água corrente morna para azular	
10	Álcool a 70°	1 min
11	Eosina-Floxina	1 min
12	Álcool a 95°	1 min
13	Álcool a 100°	1 min
14	Álcool a 100°	1 min
15	Xilol	1 min
16	Xilol	5 min
17	Secagem ao ar	
18	Montagem com lamela e meio de montagem adequado	

Anexo IV. Protocolo de AgELISA para detecção do vírus da Diarreia Bovina Viral.

Preparação das amostras

Utilizar amostras de orelha de 2-3mm de diâmetro. Adicionar 250µl do tampão de maceração e deixar macerar entre 12 e 24h à temperatura ambiente (18-25°C). Agitar a solução assim obtida com uma pipeta antes de aspirar 50µl da solução para o teste.

Protocolo

- 1 Obter as placas impregnadas com os anticorpos anti-E^{ns} e anotar a posição de cada amostra numa folha de trabalho
- 2 Adicionar 50µl de Solução de Detecção a cada pocilho
- 3 Adicionar 50µl de Controlo Negativo aos pocilhos apropriados
- 3 Adicionar 50µl de Controlo Positivo aos pocilhos apropriados
- 4 Adicionar 50µl de amostra aos pocilhos restantes, utilizando uma ponta de pipeta diferente para cada amostra
- 5 Agitar levemente as placas
- 6 Incubar por 2 horas a 37°C em câmara húmida ou 12-18h a 2-8°C. As placas devem ser seladas para evitar a evaporação
- 7 Remover o líquido dos pocilhos manual ou automaticamente
- 8 Lavar cada pocilho com cerca de 300µl de Solução de Lavagem por 5 vezes. À quinta vez, eliminar o líquido residual, batendo firmemente a placa em cima de um papel absorvente
- 9 Adicionar 100µl de Conjugado a cada pocilho
- 10 Incubar por 30 minutos à temperatura ambiente (18-25°C)
- 11 Repetir os passos 7 e 8
- 13 Adicionar 100µl de Solução de Substrato TMB a cada pocilho
- 14 Incubar por 10 minutos à temperatura ambiente (18-25°C) no escuro
- 15 Adicionar 100µl de solução STOP a cada pocilho
- 16 Calibrar o espectrofotómetro e ler a placa a 450nm
- 17 Calcular os resultados

Interpretação		
(Média de Absorvância da Amostra – Média de Absorvância do Controlo Negativo)		
≤0,200	>0,200 a ≤0,300	>0,300
Negativo	Duvidoso	Positivo

Anexo V. Protocolo de imunohistoquímica para detecção do vírus da Diarreia Bovina Viral.

Reagentes

Proteinase K: *DIGEST-ALL™ 4* (Invitrogen)

Bloqueio de reacções inespecíficas: *Novocastra™ Protein Block*

Soro primário: Soro policlonal anti-BVDV, VMRD (1:1600 em TBS com 4% Albumina Bovina e 8% FCS)

Anticorpo secundário: *Vectastain® Elite ABC Kit (Goat IgG)*, Vector Labs (1:200 em TBS com 1% Albumina Bovina)

Reagente ABC: *Vectastain® Elite ABC Kit (Goat IgG)*, Vector Labs

Diaminobenzidina (DAB): *Liquid DAB+ Substrate Chromogen System* (Dako)

Procedimentos

- | | | |
|----|--|--------|
| 1 | Desparafinar e hidratar os cortes | |
| 2 | Incubar com Proteinase K à temperatura ambiente (18-25°C) | 10 min |
| 3 | Lavar as lâminas em PBS, por 3 vezes | 5 min |
| 4 | Incubar com Solução de Bloqueio de Reacções Inespecíficas à temperatura ambiente (18-25°C) | 30 min |
| 5 | Retirar excesso de Solução de Bloqueio | |
| 6 | Incubar com o Soro Primário à temperatura ambiente (18-25°C) | 60 min |
| 7 | Repetir passo 3 | 5 min |
| 8 | Incubar com Solução de Bloqueio da Peroxidase Endógena (H ₂ O ₂ a 3% em água corrente) | 20 min |
| 9 | Repetir passo 3 | 5 min |
| 10 | Incubar com Anticorpo Secundário Biotinilado à temperatura ambiente (18-25°C) | 30 min |
| 11 | Repetir passo 3 | 5 min |
| 12 | Incubar com Reagente ABC | 30 min |
| 13 | Repetir passo 3 | 5 min |
| 14 | Revelar com diaminobenzidina | 3 min |
| 15 | Lavar as lâminas em água corrente | |
| 16 | Efectuar o contraste nuclear com Hematoxilina de Mayer | 30s |
| 17 | Lavar em água corrente para azular | |
| 18 | Desidratar os cortes e montar as lâminas com lamela e meio de montagem apropriado | |

